



**Catarina Pires dos Santos da Fonseca**

Licenciada em ciências da Engenharia Física

## **Aplicação de fluorescência de raios-x para caracterização de elementos tóxicos em exosqueletos de moluscos**

Dissertação para obtenção do Grau de  
Mestre em Engenharia Física

Orientador: António Alberto Dias, Professor Auxiliar,  
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno,  
Professora Auxiliar Convidada,  
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutor Filipe Alexandre Ferreira Tiago de Oliveira

Arguente: Doutor Pedro Manuel Ferreira Amorim

Vogal: Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



## **Aplicação de fluorescência de raios-x para caracterização de elementos tóxicos em exosqueletos de moluscos**

Copyright © Catarina Pires dos Santos da Fonseca, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.





*"I have not failed.  
I've just found 10.000 ways that won't work"*  
~Thomas Edison



## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aos meus Orientadores, Professor António Dias e Professora Sofia Pessanha, pelo apoio e conselhos que me deram.

Agradeço á UNL-FCT, por todos estes anos de formação académica e humana.

Agradeço ao Departamento de Física pela disponibilidade e cuidado na formação de todos os alunos.

Um obrigada ao LIBPhys por me ter recebido durante a licenciatura, e por ter sido uma motivação para continuar a estudar Engenharia Física.

Um especial agradecimento ao Professor José Paulo Santos e à Professora Maria Luísa de Carvalho pela integração no centro de investigação, pelo primeiro artigo publicado e por me terem inspirado.

Um especial agradecimento ao Museu de Arqueologia de Almada por ter cedido as amostras para o meu trabalho.

Agradeço ao meu camarada Guilherme Pereira pela amizade, por ter sido meu parceiro em diversos trabalhos de grupo e por todas as aventuras nestes anos que passaram.

Aos amigos que fiz na faculdade e ficarão comigo para a vida - Mariana Eloy, Isabel Allegro, Matilde, Toledo, Tiago, Diogo Miguel, Gonçalo Tomás, Jorge Barreto, Pedro Silva e João Lourenço - agradeço todas as aventuras que me proporcionaram.

Às minhas colegas de Laboratório, Sara Coutinho e Maria Pia por toda a troca de ideias.

Agradeço ao Hugo, por me ter ajudado a adaptar/integrar ao mundo Universitário.

Agradeço aos meus afilhados de curso por terem feito parte da minha vida académica.

A todos os que acreditaram que valia a pena re-abrir o NEFCT, obrigada por todo o apoio.

Um especial agradecimento aos meus colegas, André Rebelo, Ana Samouco e Ricardo Adão, pela ajuda que me deram no software OriginLab.

Um especial agradecimento aos meus Pais, por me terem permitido estudar e por sempre me terem apoiado e acreditado nas minhas capacidades.

Agradeço ao meu irmão, Henrique Fonseca, por me ter aconselhado na escolha do curso e por sempre me ter apoiado e motivado.

Aos meus amigos Catarina, Francisco, Manuel, Clara, Frederico, João Veiga e Ana Morgado, agradeço por todas as secas que levaram a ouvir falar de Física e da minha tese.

Ao Vivaldi por ter composto "The Four Seasons", que me acompanhou sempre no estudo.

Por fim, agradeço ao meu namorado António Barroso, por toda a paciência que teve ao longo do curso, principalmente nesta última fase, pelos trabalhos que fizemos juntos, pelas noites a estudar e por toda a diversão da vida académica que partilhou comigo.



## RESUMO

---

O objetivo deste projeto é a aplicação de fluorescência de raios-x para a quantificação dos elementos traço presentes em exosqueletos de moluscos recolhidos no estuário do Tejo ao longo de vários séculos.

Pretende-se escolher o método quantitativo que melhor se adequa às nossas amostras, exosqueletos de ameijoas. Para o cálculo quantitativo, recorreu-se aos métodos dos Parâmetros Fundamentais (PF) e aos métodos comparativos com amostras padrão. Por não existirem padrões disponíveis com a mesma matriz das amostras ( $\text{CaCO}_3$ ), recorreu-se a métodos de correção das intensidades com os picos de dispersão. As correções aplicadas são a correção com o pico de Compton, correção com a razão dos picos Compton e Rayleigh (C/R), a correção com a razão dos picos Rayleigh e Compton (R/C). Os resultados obtidos com estas metodologias são ainda confrontados com os resultados obtidos sem qualquer correção das intensidades.

As amostras cedidas pelo Museu de Arqueologia de Almada estão datadas do fim da idade do Bronze até ao século XV e foram todas recolhidas na zona de Almada. Para termos comparação com a atualidade, adquiriu-se um conjunto de amostras da zona do Barreiro.

Conclui-se que o método mais adequado para quantificar as nossas amostras é o da correção com o pico de Compton e que o ferro foi o elemento que apresentou maior variação da concentração com o tempo.

**Palavras-chave:** EDXRF, bivalves, padrões, métodos quantitativos, correção de Compton, elementos traço.

---



## ABSTRACT

---

The main purpose of this project is the application of X-ray fluorescence to quantify the trace elements in shellfish exoskeletons.

We aimed at choosing a quantitative method that rendered the best results for the shellfish exoskeletons samples. For the quantitative calculation it will be used the Fundamental Parameters Method and some comparative methods. The latter are based on standard reference materials (SRM), however, there are no SRM with  $\text{CaCO}_3$  matrix available, only bone, calcium phosphate. This way, we corrected the characteristic intensities using the dispersion peaks. The used methods that were correction with Compton peak, correction with Compton/Rayleigh (C/R) ratio with Rayleigh/Compton (R/C) ratio and with no corrections.

The samples that were used in this thesis, were provided by Museu de Arqueologia de Almada. There are samples from the ending years of the Bronze age to the XV century belonging to Tejo's river estuary. In order to have the comparison with current times, we also acquired some samples of the Barreiro area recently in the market.

The most efficient method to do elemental quantification on our samples was the correction using the Compton peak method and Fe is the only element that suffered a variation on its concentration over time.

**Keywords:** EDXRF, shellfish, reference materials, quantitative methods, Compton correction, trace elements.

---





# CONTEÚDO

<b>Lista de Figuras</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xix</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo . . . . .	1
1.2 Contexto arqueológico . . . . .	2
<b>2 Fundamentos físicos</b>	<b>5</b>
2.1 Raios-x . . . . .	5
2.2 Fluorescência de raios-x . . . . .	6
2.2.1 Transições radiativas e não radiativas . . . . .	6
2.3 Produção de raios-x . . . . .	8
2.4 Espectro de raios-x . . . . .	10
2.5 Interação da radiação com a matéria . . . . .	10
2.6 Detecção de raios-x . . . . .	12
2.7 Limites de Detecção . . . . .	13
<b>3 Equipamentos de EDXRF</b>	<b>15</b>
3.1 Geometria convencional com micro feixe . . . . .	15
3.2 Geometria Tri-axial . . . . .	17
<b>4 Métodos quantitativos</b>	<b>19</b>
4.1 Efeitos de Matriz . . . . .	20
4.2 Métodos Matemáticos . . . . .	21
4.2.1 Parâmetros Fundamentais . . . . .	21
4.3 Métodos Comparativos . . . . .	22
4.3.1 Métodos de Compensação . . . . .	22
4.3.2 Método de Correção de Absorção . . . . .	25
<b>5 Metodologia</b>	<b>27</b>
5.1 Procedimento experimental . . . . .	27
5.1.1 Preparação das amostras . . . . .	27
5.1.2 Análise das amostras . . . . .	27

5.1.3	Tratamento de dados . . . . .	29
5.2	Métodos quantitativos usados . . . . .	31
5.2.1	Método dos parâmetros fundamentais . . . . .	31
5.2.2	Método comparativo com correção de intensidades . . . . .	31
5.2.3	Validação do método . . . . .	33
5.2.4	Implementação dos métodos . . . . .	34
6	<b>Análise de resultados</b>	<b>35</b>
7	<b>Conclusões</b>	<b>43</b>
8	<b>Trabalhos Futuros</b>	<b>45</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>47</b>
A	<b>Anexo</b>	<b>51</b>
B	<b>Apêndices</b>	<b>59</b>

## LISTA DE FIGURAS

1.1	Localização da Casa do Maestro Leonel Ferreira no mapa [2] . . . . .	2
1.2	Localização da Casa do Maestro Leonel Ferreira em mapa topográfico [2] . .	2
1.3	Distribuição espacial das concentrações de cádmio e chumbo ( $\mu g/g$ ) no estuário do Tejo [4] (Adaptado de Vale et al., 2008) . . . . .	4
2.1	Espetro eletromagnético [6] . . . . .	5
2.2	Esquema das transições radiativas . . . . .	7
2.3	Gráfico comparativo dos rendimentos de Auger e de fluorescência em função do número atómico, adaptada de [9] . . . . .	8
2.4	Esquema de um tubo de raios-x com janela lateral, adaptado de [11] . . . . .	9
2.5	Espetros contínuo e característico aplicando diferentes tensões[12] . . . . .	10
2.6	Esquema representativo da atenuação e um feixe de raios-x num alvo . . . . .	11
2.7	Esquema do efeito fotoelétrico . . . . .	11
2.8	Ilustração dos efeitos predominantes na atenuação de raios-x, adaptada de [14]	12
2.9	Esquema da dispersão de Compton . . . . .	12
3.1	Esquema de um SDD [7] . . . . .	16
3.2	Esquema de um espectrómetro com geometria convencional de micro feixe [7]	16
3.3	Esquema da montagem de EDXRF com geometria Tri-axial: (1)Tubo de raios-x,(2) Filtro de prata, (3) Alvo secundário de Mo, (4) Colimadores, (5) Amostra, (6) Detetor de Si(Li). [20] . . . . .	17
4.1	Fluxograma dos diversos métodos quantitativos existentes . . . . .	19
4.2	Gráfico da variação da intensidade relativa do Fe e a fração mássica do Fe: Curva A-efeitos matriz desprezáveis; B-Matriz FeCr; C-Matriz FeNi; D-Matriz FeMn [23] . . . . .	20
4.3	Figura adaptada de [13] (a)Taxa de contagem do $SrK\alpha$ em função da concentração de Sr (b) razão entre a taxa de contagem da radiação $SrK\alpha$ e do pico de Compton está em função da concentração de Sr. . . . .	25
5.1	Fotografia de várias espécies de conchas: 1- Crassostrea Gigas (ostra); 2- Donax (conquilha); 3- Mytilus edulis (mexilhão); 4- Cerastoderma edule (berbigão); 5- Spisula solida (ameijoia) e 6- Concholepas concholepas (caracol do mar). . . .	28
5.2	M4Tornado da Bruker - equipamento de EDXRF com geometria convencional	28

5.3	Equipamento de EDXRF com geometria Tri-axial . . . . .	28
5.4	Esquema explicativo do protocolo de aquisição usado pelo M4Tornado. . . .	29
5.5	Espectro do padrão caprine04 obtido com o tornado, onde a linha de base é representada pela linha verde e o ajuste dos picos pela linha vermelha . . . .	30
5.6	Espectro do padrão caprine04 obtido com o Tri-axial, onde a linha de base é representada pela linha verde e o ajuste dos picos pela linha vermelha . . . .	30
5.7	Regressões linear para o Ca aplicando a correção com o pico de Compton. Os gráficos do lado direito correspondem aos dados adquiridos com o Tornado e os do lado esquerdo pelo Tri-axial . . . . .	32
5.8	Regressões linear para o Fe aplicando a correção com o pico de Compton. Os gráficos do lado direito correspondem aos dados adquiridos com o Tornado e os do lado esquerdo pelo Tri-axial . . . . .	32
5.9	Regressões linear para o Zn aplicando a correção com o pico de Compton. Os gráficos do lado direito correspondem aos dados adquiridos com o Tornado e os do lado esquerdo pelo Tri-axial . . . . .	32
5.10	Regressões linear para o Pb aplicando a correção com o pico de Compton. Os gráficos do lado direito correspondem aos dados adquiridos com o Tornado e os do lado esquerdo pelo Tri-axial . . . . .	33
5.11	Regressões linear para o Sr aplicando a correção com o pico de Compton. Os gráficos do lado direito correspondem aos dados adquiridos com o Tornado e os do lado esquerdo pelo Tri-axial . . . . .	33
5.12	Espectros de uma amostra do século XXI adquiridos com os equipamentos a)Tornado e b)Tri-axial. . . . .	34
6.1	Gráfico das concentrações do Ca, obtidas no tornado, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton. . . . .	36
6.2	Gráfico das concentrações do Ca, obtidas no Tri-axial, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton. . . . .	36
6.3	Gráfico das concentrações do Fe, obtidas no tornado, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton. . . . .	37
6.4	Gráfico das concentrações do Fe, obtidas no Tri-axial, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton. . . . .	37
6.5	Gráfico das concentrações do Zn, obtidas no tornado, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton. . . . .	38
6.6	Gráfico das concentrações do Zn, obtidas no Tri-axial, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton. . . . .	38
6.7	Gráfico das concentrações do Pb, obtidas no tornado, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton. . . . .	39
6.8	Gráfico das concentrações do Pb, obtidas no Tri-axial, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton. . . . .	39

6.9	Gráfico das concentrações do Sr, obtidas no tornado, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton. . . . .	40
6.10	Gráfico das concentrações do Sr, obtidas no Tri-axial, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton. . . . .	40
6.11	Evolução da concentração dos vários elementos desde a Idade do Bronze até à atualidade. . . . .	41



## LISTA DE TABELAS

1.1	Época das amostras e local de recolha . . . . .	1
5.1	Quantificação do padrão caprine04 obtido no M4Tornado ( $E=10^\circ$ ) . . . . .	34
5.2	Quantificação do padrão caprine04 obtido no Tri-axial ( $E=10^\circ$ ) . . . . .	34





## GLOSSÁRIO

**C/R** Compton e Rayleigh.

**DL** limites de detecção (*detection limit*).

**EDXRF** fluorescência de raios-x dispersiva em energia (*Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*).

**FWHM** largura a meia altura (*full width at half maximum*).

**PF** Parâmetros Fundamentais.

**R/C** Rayleigh e Compton.

**SR-micro-XRF** micro fluorescência de raios-x com feixe de radiação de sincrotrão (*Synchrotron -radiation-induced micro X-ray fluorescence*).

**SRM** standard reference materials.

**SRXRF** Fluorescência de raios-x por radiação de sincrotrão (*Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence*).

**TXRF** Fluorescência de raios-x por reflexão total (*Total Reflection X-ray Fluorescence*).

**WDXRF** fluorescência de raios-x dispersiva em comprimento de onda (*Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence*).

**XRF** fluorescência de raios-x (*X-ray fluorescence*).



## INTRODUÇÃO

### 1.1 Objetivo

Este trabalho, pretende estudar a evolução da poluição no estuário do Tejo, na zona de Almada, ao longo de vários séculos, quantificando os elementos traço presentes em exosqueletos de bivalves.

A realização deste trabalho só foi possível porque o Museu de Arqueologia de Almada cedeu amostras de exosqueletos de bivalves do seu espólio, desde o fim da idade do Bronze (2055-1650 a.c.) até ao século XV, devidamente datados.

No diagrama abaixo está representada a escala de tempo a que pertencem as amostras.



Neste trabalho, também foram analisadas amostras do século XXI, que foram adquiridas num mercado e a recolha terá sido feita no estuário do Tejo na zona do Barreiro.

Na tabela 1.1 estão representadas todas as épocas das nossas amostras e o local de onde foram recolhidas.

Tabela 1.1: Época das amostras e local de recolha

Época	Local
Idade do Bronze	Quinta do Percejo
Século VII a.c.	Quinta do Almaraz
Século XII	Quinta de Castro
Século XV	Casa do Maestro
Século XXI	Barreiro

Para a análise das amostras serão utilizados dois espectrómetros de fluorescência

de raios-x dispersivos em energia, um de geometria Tri-axial e outro com geometria convencional de micro-feixe (M4Tornado).

Os dois equipamentos trabalham com *softwares* que determinam a concentração dos elementos da amostra aplicando o método dos parâmetros fundamentais. No entanto, neste trabalho também estamos interessados em escolher o melhor método quantitativo para as amostras em estudo. O método dos padrões externos seria uma ótima opção para quantificar as amostras, no entanto, não temos padrões com matriz de carbonato de cálcio  $\text{CaCO}_3$  (95% da matriz das conchas). [1] Por esta razão os padrões que serão usados são de osso, por terem uma matriz semelhante, fosfato de cálcio ( $\text{CaPO}_4$ ). Assim sendo é possível utilizar métodos de correção das intensidades características baseados nos picos de dispersão. Este novo método, combina a utilização de padrões externos recorrendo a correções com os picos de dispersão, para a correção da absorção.

Para calcular as áreas dos picos característicos foi usado o *software* OriginPro® 2015.

O  $\text{CaCO}_3$  é obtido da seguinte forma, equação 1.1.



## 1.2 Contexto arqueológico

Neste trabalho serão analisados exosqueletos que foram recuperados durante trabalhos arqueológicos. Um destes trabalhos realizou-se em 2010, no início da construção do Museu da Música Filarmónica, em Almada, (Fig.1.1 e 1.2).



Figura 1.1: Localização da Casa do Maestro Leonel Ferreira no mapa [2]



Figura 1.2: Localização da Casa do Maestro Leonel Ferreira em mapa topográfico [2]

Na unidade estratigráfica de onde foram recolhidos os exosqueletos, foram também encontrados objetos cerâmicos que se enquadram entre o final do século XV e o século XVI, nomeadamente as faianças e os objetos de uso comum. Por esta razão, dataram os exosqueletos no mesmo intervalo de tempo. [2]

Os exosqueletos pertencentes às restantes épocas, foram datados do mesmo modo.

Já foram realizados diversos estudos para a determinação de metais pesados em moluscos bivalves como os mexilhões ou *blue-mussel*, ameijola ou *smooth calista*, ostra ou *portuguese oyster*, amêijoa-japonesa ou *manila clam* e lambujinha ou *peppery furrow* [3].

O consumo de bivalves pelo homem pode ser problemático, pois o organismo humano não é capaz de digerir toxinas como o mercúrio, o cádmio e o chumbo presentes nos bivalves [3].

Devido à sua biologia, os bivalves são bons bio-indicadores da poluição, por metais pesados e químicos em águas costeiras [3].

A composição dos moluscos bivalves pode variar significativamente de espécie para espécie e dentro “da mesma espécie devido a fatores genéticos, fisiológicos, grau de maturação sexual, idade, sexo, zona geográfica, época do ano, dieta e disponibilidade alimentar, ambientais (temperatura da água, salinidade, oxigénio dissolvido), sistema de cultivo, manuseamento e condições de conservação” [2]. Se algum destes fatores for alterado, o metabolismo do molusco também será alterado. O aumento de temperatura, provoca maior quantidade de água filtrada e aumento do ritmo respiratório do bivalve [4].

Apesar de estarmos a estudar o exosqueleto e não o molusco, por época serão analisadas várias conchas, com cerca de 3 cm de comprimento, e será utilizado o valor médio dos resultados obtidos.

A obtenção dos nutrientes e oxigénio, pelos bivalves, é feita através de filtragem de grandes volumes de água que contêm partículas em suspensão ou através dos detritos da matéria orgânica em decomposição sobre sedimentos. Deste modo, eles acabam por incorporar no seu organismo “contaminantes químicos como o mercúrio, o cádmio e o chumbo, ou biológicos, como bactérias, vírus, parasitas e microalgas” [3]. Estes contaminantes encontram-se naturalmente no ambiente, no entanto, a atividade humana pode agravar a presença e alterar a sua distribuição na natureza. [3]

No caso do estuário do Tejo, onde foram recolhidas as amostras para os estudos apresentados, a maior concentração de metais pesados é verificada “junto às antigas indústrias metalúrgicas e nalgumas regiões mais afastadas do estuário” [4]. A distribuição de cádmio e chumbo no estuário do Tejo, em 2012, presente na figura 1.3.

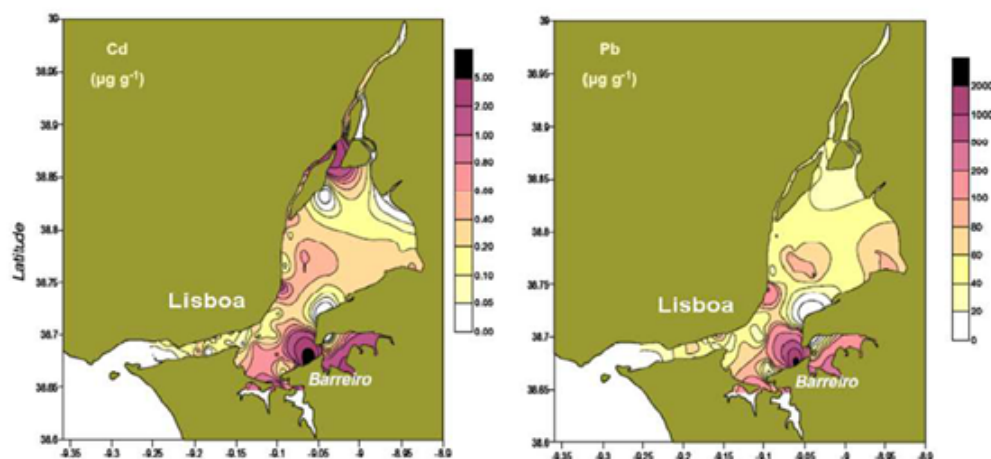


Figura 1.3: Distribuição espacial das concentrações de cádmio e chumbo ( $\mu\text{g/g}$ ) no estuário do Tejo [4] (Adaptado de Vale et al., 2008)

No estudo realizado na Costa do Golfo da Arábia Saudita, foram utilizados exosqueleto de *Diodora funiculata*, *Lunella coronata*, *Cerithium caeruleum*, *Barbatia parva*, *Pinctada margaritifera*, *Amiantis umbonella*, *Acrosterigma assimile* e *Asaphis violascens*, recolhidos em cinco localidades diferentes. [5]

O objetivo deste estudo era determinar as concentrações de Ferro (Fe), Cobre (Cu), Chumbo (Pb), Manganês (Mn), Cádmio (Cd), Selénio (Se), Arsénio (As), Cobalto (Co), Boro (B), Crómio (Cr), Mercúrio (Hg), Molibdénio (Mo), existentes nas amostras. [5]

Um outro estudo realizado por Hala Ali Abdel-Salam, na Faculdade de Ciências da Universidade do Cairo, teve como objetivo o estudo da composição Bioquímica e da concentração de metais pesados em exosqueletos de moluscos e crustáceos. [5]

Quantificar em espectroscopia de fluorescência de raios-x dispersiva em energia (EDXRF) não é um processo fácil, porque para usar PF temos de conhecer bem a amostra ou no caso do uso de padrões externos, é preciso que existam padrões adequados às amostras em estudo.

Deste trabalho já resultaram três posters, que se encontram em apêndice.

O documento está organizado do seguinte modo. No capítulo 2 são explicados os conceitos físicos relevantes para este trabalho. No capítulo 3 os equipamentos que serão usados e alguma teoria sobre as componentes dos equipamentos. Os estado da arte dos métodos quantitativos está descrito no capítulo 4. O procedimento experimental e a escolha do Nosso método quantitativo está descrita na metodologia, que é o capítulo 5. A análise de resultados encontra-se no capítulo 6. As conclusões e perspetivas de trabalhos futuros encontra-se no capítulo 7 e 8, respetivamente.

## FUNDAMENTOS FÍSICOS

### 2.1 Raios-x

Em 1895, o Físico Alemão, Wilhelm Conrad Röntgen, enquanto estudava o fenômeno da luminescência produzida por raios catódicos num tubo de Crookes, descobriu acidentalmente os raios-x.

Através da observação das descargas que ocorriam no tubo de Crookes, Röntgen verificou que mesmo cobrindo o tubo com papel preto o fenômeno da fluorescência, num cartão com sais de bário que se encontrava junto ao tubo de Crookes, sucedia.

A radiação x é uma das formas de radiação eletromagnética. Tipicamente esta apresenta um comprimento de onda entre  $10^{-12}$  m e  $10^{-9}$  m e uma energia aproximada ente 0,125 keV e 125 keV (Figura 2.1) Os raios-x com energia até 5 keV são chamados raios-x moles e os demais raios-x duros.

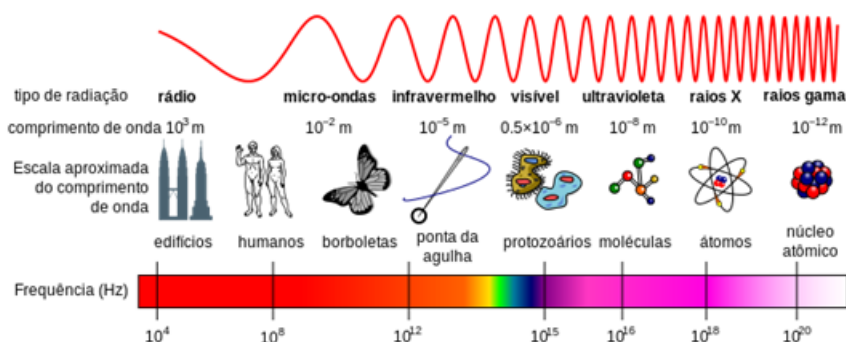


Figura 2.1: Espectro eletromagnético [6]

Os raios-x apresentam as seguintes propriedades:

- São invisíveis;
- Propagam-se à velocidade da luz,  $3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ ;
- Não são afetados por campos elétricos e magnéticos;
- A absorção varia com a espessura, densidade e a composição da amostra;
- Podem ser refletidos, difratados, refratados e polarizados.

A espectroscopia de raios-x dispersivos em energia fluorescência de raios-x dispersiva em energia (*Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*) (EDXRF), foi a técnicas da fluorescência de raios-x utilizada para análise qualitativa e quantitativa de elementos traço existentes na amostra. Para além desta técnica ser não destrutiva, permite a aquisição de sinal num curto intervalo de tempo e as amostras não requerem grande preparação. Outra das vantagens desta técnica prende-se com a deteção de todo o espectro em simultâneo.[7]

## 2.2 Fluorescência de raios-x

A fluorescência de raios-x é um fenómeno utilizado em EDXRF .

Para proceder a esta análise a amostra é ionizada por uma fonte de radiação externa.

[8] Como resultado da ionização podem ocorrer **transições radiativas** e **transições não radiativas**.

### 2.2.1 Transições radiativas e não radiativas

A principal diferença entre as transições radiativas e as transições não radiativas é que as transições radiativas emitem fotões. As **transições radiativas** podem ocorrer, se a energia do feixe incidente for superior à energia de ligação de um eletrão das camadas mais internas do átomo. Nesta situação o eletrão absorve parte da energia e é ejetado, formando uma lacuna, posteriormente ocupada por um eletrão de uma camada superior, que ao transitar liberta um fotão de raios-x.[8]

As transições radiativas continuam a ocorrer até a lacuna se posicionar na camada mais externa do átomo e um eletrão livre do meio a preencher (Figura 2.2).



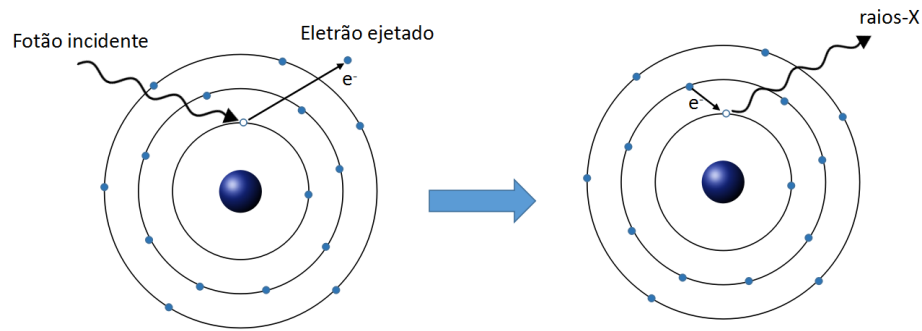


Figura 2.2: Esquema das transições radiativas

Nas **transições não radiativas**, quando um elétron de uma camada superior preenche a lacuna, é emitido, após rearranjo da estrutura eletrônica, um elétron de um estado eletrônico exterior ao invés de um fóton como acontece nas transições radiativas. Este processo designa-se por **efeito de Auger**.

Para além do efeito de Auger, por vezes ocorre uma transição de um elétron de uma subcamada superior na mesma camada, (por exemplo: um elétron transitar da subcamada p para uma s, em vez de transitar da camada L para a K como se verifica no efeito de Auger), a esta transição interna dá-se o nome de transição de Coster-Kronig.

[8] O rendimento de fluorescência indica a probabilidade de ocorrer uma transição radiativa, nas camadas interiores, para que a lacuna deixada pelo efeito fotoelétrico, seja preenchida.

Como se pode verificar na Figura 2.3, o efeito de Auger é mais provável para átomos com menor  $Z$ , pois a probabilidade de ocorrência deste processo é maior caso o intervalo, entre os estados energéticos onde se encontram a lacuna e o elétron de Auger, seja menor.

As transições radiativas, predominam para átomos com  $Z$  maior.

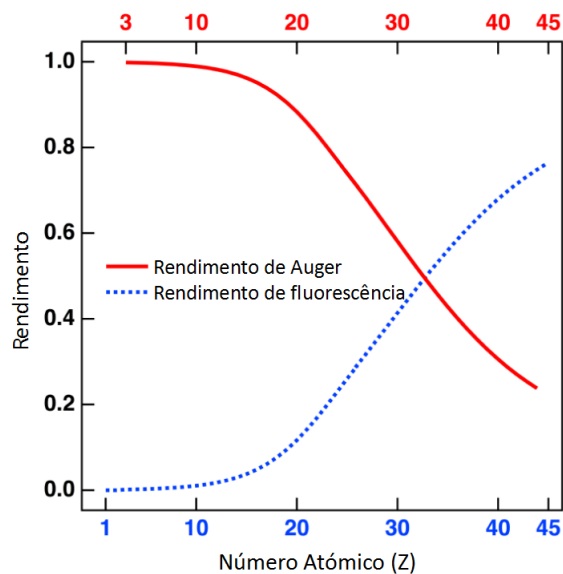


Figura 2.3: Gráfico comparativo dos rendimentos de Auger e de fluorescência em função do número atômico, adaptada de [9]

Como o rendimento de fluorescência é muito baixo para elementos com número atômico pequeno, a espectrometria de raios-x apresenta pouca sensibilidade para estes elementos.

## 2.3 Produção de raios-x

Neste trabalho, utilizou-se um tubo de raios-x como fonte de ionização. A produção de raios-x pode ocorrer através de dois processos: desaceleração de partículas carregadas e transições eletrônicas nas camadas mais internas do átomo.

A produção de raios-x dentro do tubo, advém do aquecimento de um filamento, o cátodo, que emite um feixe de elétrons, que são acelerados, em direção ao ânodo, através de um campo elétrico como se encontra esquematizado na Figura 2.4 [10].

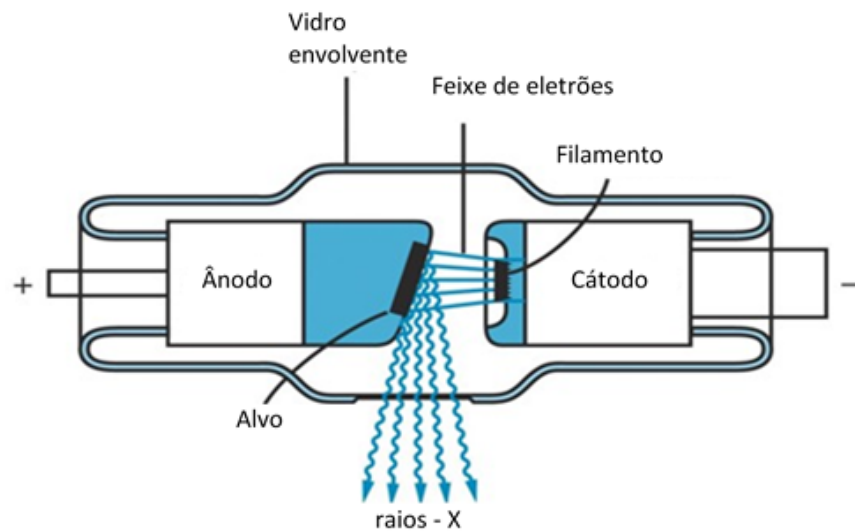


Figura 2.4: Esquema de um tubo de raios-x com janela lateral, adaptado de [11]

A produção de raios-x, num tubo de raios-x, pode ocorrer através de dois processos: desaceleração de partículas carregadas e transições eletrônicas nas camadas mais internas do átomo.

- Desaceleração de partículas carregadas

A **radiação contínua** é também conhecida por **radiação de *Bremsstrahlung***, que traduzindo do alemão *Brems* significa travagem e *strahlung* significa radiação.

Esta travagem é devida à interação do campo de Coulomb do núcleo com o feixe de fótons, que provoca uma diminuição da energia cinética. Esta diminuição é traduzida pela emissão de um fóton com energia igual à variação da energia cinética gerada pela travagem.[8]

O resultado desta interação, é a obtenção de um espectro contínuo de energias [8].

- Transições eletrônicas nas camadas internas do alvo

Enquanto existirem lacunas nas camadas eletrônicas, o átomo não se encontra no estado fundamental.

O fóton emitido devido a uma transição radiativa, possui uma energia correspondente à diferença de energia das camadas envolvidas na transição, obtendo-se deste modo **riscas características** do material do ânodo do tubo de raios-x. A Figura 2.5 representa três espectros que foram obtidos com diferentes tensões, que apresenta raios-x contínuos e característicos.

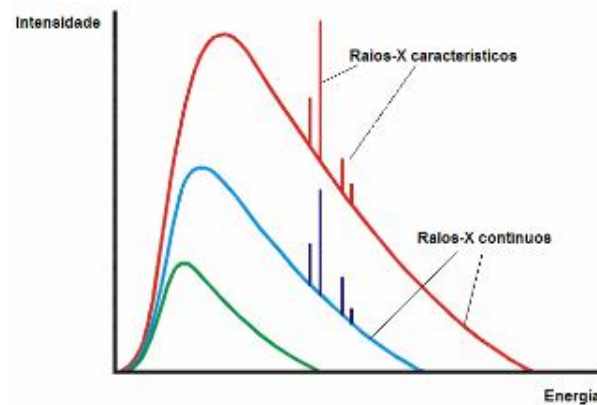


Figura 2.5: Espectros contínuo e característico aplicando diferentes tensões[12]

Para determinar a energia dos raios-x característicos utiliza-se a lei de Moseley's, equação 2.1.

$$E = K(Z - \sigma)^2 \quad (2.1)$$

Onde  $K$  é uma constante para uma determinada série espectral,  $Z$  é o número atômico do elemento e  $\sigma$  é a constante de blindagem.

## 2.4 Espectro de raios-x

Um espectro de raios-x para além das riscas características e do fundo pode também conter artefactos 2.5.

Quando o efeito fotoelétrico ocorre no centro do detetor, os raios-x característicos do material do detetor, neste caso de Si, são reabsorvidos e contribuem para a energia total do pico. No entanto, quando este fenómeno ocorre na periferia do detetor existe uma grande probabilidade dos raios-x característicos escaparem e existe uma perda de energia em relação à energia do sinal. No caso dos detetores de Si, o pico de escape terá uma energia igual à energia do pico menos 1,74 keV, que corresponde à energia característica do Si.[13] O pico soma é outro artefacto que pode aparecer num espectro de raios-x. Este pico surge de uma sobreposição específica de picos, onde dois fótons de alta intensidade chegam ao mesmo tempo ao detetor. O pré-amplificador do detetor não consegue fazer a distinção destes dois picos em separado, e assume que existe apenas um com a soma da energia dos dois.[13]

## 2.5 Interação da radiação com a matéria

O feixe de raios-x com uma intensidade  $I_0$  atinge a amostra. O feixe de raios-x ao interagir com a amostra perde intensidade, passando a ser  $I_x$ .

Na figura 2.6, está ilustrada esta perda de intensidade.

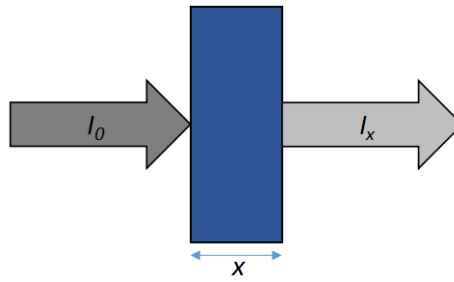


Figura 2.6: Esquema representativo da atenuação de um feixe de raios-x num alvo

A atenuação do feixe é descrita pela lei de Beer-Lambert,

$$I_x = I_0 \times \exp[-(\mu/\rho)\rho x] \quad (2.2)$$

A intensidade varia exponencialmente com a espessura da amostra,  $x$  (cm) e da sua densidade,  $\rho$  (g/cm<sup>3</sup>), bem como do coeficiente de atenuação mássico, que corresponde à razão entre o coeficiente de atenuação linear e a densidade,  $\mu/\rho$  (cm<sup>2</sup>/g).

Desta interação podem resultar dois efeitos: absorção fotoelétrica e dispersão de raios-x.

- Absorção fotoelétrica

O efeito fotoelétrico, representado na Figura 2.7, ocorre, quando o átomo é bombardeado com fótons, com energia igual ou superior à energia de ligação dos eletrões das orbitais mais internas. Desta interação pode resultar a ejeção do eletrão com uma energia cinética igual à diferença de energia do fóton incidente e da energia de ligação do eletrão na orbital.

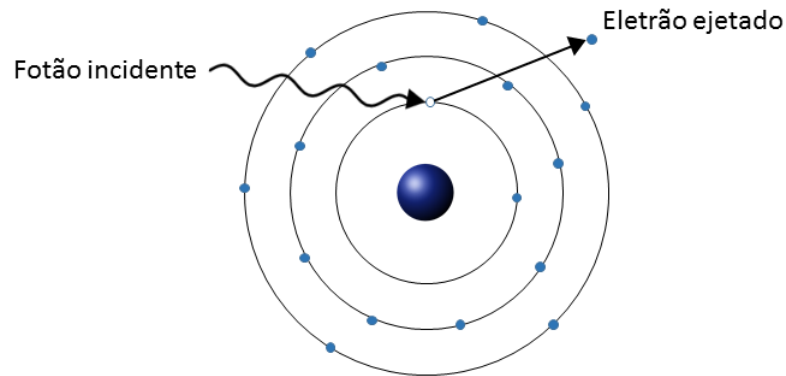


Figura 2.7: Esquema do efeito fotoelétrico

De todos os efeitos relacionados com a atenuação dos raios-x, o efeito fotoelétrico, é o efeito dominante para baixas energias, i.e., para energias inferiores a 100 keV, Figura 2.8. Numa proporção mais pequena, mas ainda assim notável, consegue-se observar fenómenos de dispersão de raios-x. Já a produção de pares não se observa para energias menores que 1000 keV, deste modo não será abordada no decorrer deste trabalho, Figura 2.8.

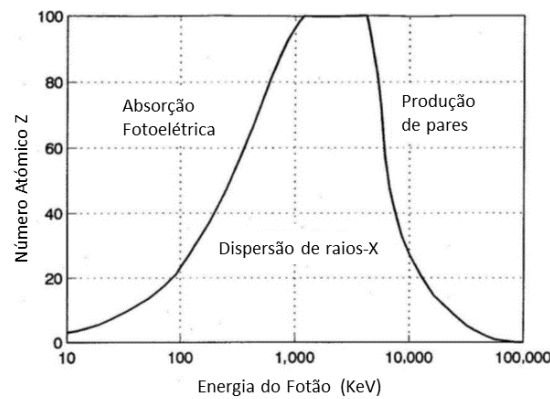


Figura 2.8: Ilustração dos efeitos predominantes na atenuação de raios-x, adaptada de [14]

- Dispersão de raios-x

Quando um fóton interage com a amostra, ocorre dispersão, que pode ser do tipo coerente ou incoerente.

A dispersão coerente ou de **Rayleigh**, acontece quando a colisão é elástica, i.e., o átomo não fica ionizado nem excitado.

O feixe inicial é disperso sem alterar a frequência, e tendo uma relação de fase bem definida entre os feixes incidente e disperso. Este efeito é predominante, para baixas energias e elementos de Z maiores.

A dispersão incoerente ou de **Compton**, é a interação de um fóton com um elétron menos ligado, que leva a uma mudança de direção do fóton e uma consequente perda de energia. O efeito de Compton encontra-se esquematizado na Figura 2.9.

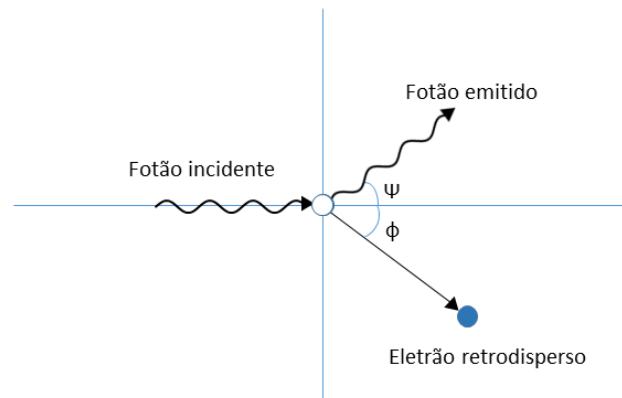


Figura 2.9: Esquema da dispersão de Compton

## 2.6 Detecção de raios-x

Todos os detetores têm o mesmo princípio: a transferência de pelo menos alguma parte da energia da radiação para o detetor, onde esta é convertida para impulsos elétricos, por

serem mais acessíveis à percepção humana [15].

Este é caracterizado pelas suas dimensões, tais como, a espessura da janela, área ativa, dimensão do cristal, composição do cristal, etc. e pelos seus parâmetros de trabalho, a resolução, a sensibilidade, a eficiência, a taxa de contagens e os limites de detecção (*detection limit*) (DL) [15].

A resolução define a capacidade do detetor de distinguir dois fótons com energias muito próximas. Esta é definida como a largura a meia altura (*full width at half maximum*) (FWHM) da linha  $K_{\alpha}$  do Mn (5,9 keV) [16].

A sensibilidade corresponde à capacidade do detetor de produzir um impulso para um dado tipo de radiação e energia [15].

A eficiência do detetor depende da quantidade de fótons que são detetados, em relação ao número de fótons emitidos pelo tubo de raios-x.

A taxa de contagens é a razão do número de fótons detetados por unidade de tempo.

## 2.7 Limites de Detecção

Os limites de detecção (DL) de um determinado sistema, determina a concentração mínima que é detetada de um dado elemento  $i$ . Estes podem ser calculados recorrendo à equação 2.3 [16].

$$DL = \frac{3C_i\sqrt{N_b}}{N_p} \quad (2.3)$$

Onde  $C_i$  é a concentração do elemento  $i$ ,  $N_p$  corresponde ao número de contagens do pico calculadas através da área do mesmo,  $N_b$  corresponde ao número de contagens de fundo, calculadas através da área abaixo da área do pico [16].

Por não se ter obtido o valor de  $N_b$ , não foi possível calcular os limites de detecção.

Em anexo, encontra-se calculados os limites de detecção para os mesmos padrões que foram utilizados neste trabalho e seguindo o mesmo protocolo de aquisição, obtidos por Dias *et al.* [17]





## EQUIPAMENTOS DE EDXRF

Para a realização deste trabalho foram usados dois espectrómetros com diferentes geometrias: geometria convencional de micro feixe e geometria Tri-axial.

### 3.1 Geometria convencional com micro feixe

Nos espectrómetros, com geometria convencional, o sistema é simplesmente constituído pelo tubo de raios-x e pelo sistema de detecção.

O espectrómetro com geometria convencional que foi utilizado neste trabalho foi o M4Tornado da Bruker.[7] Este equipamento apresenta um micro feixe que se consegue obter recorrendo a lentes poli-capilares. O feixe de raios-x é produzido num tubo com janela lateral de Be através da excitação do ânodo de Rh. O feixe de raios-x passa por uma lente poli-capilar, constituída por inúmeros tubos de vidro oco com diâmetros muito pequenos (inferior a  $2\text{ }\mu\text{m}$ ), que possibilitam a obtenção de um feixe focalizado, com cerca de  $25\text{ }\mu\text{m}$ , devido a sucessivas reflexões totais do feixe dos raios-x provenientes do tubo.[7] Quando o feixe interage com a amostra, são criados e emitidos raios-x característicos, que são captados pelo detetor dispersivo em energia.

Este equipamento contém um *silicon drift detector*, SDD, que por possuir uma elevada resolução em energia, permite uma boa separação dos picos no espectro. O detetor tem como princípio de funcionamento a medição da energia dos fótons incidentes, através da ionização produzida no material do detetor.[7]

Como se pode observar na figura 3.1, estes detetores assumem uma geometria cilíndrica, em que o ânodo é um círculo que ocupa a posição central e os elétrodos são anelares concêntricos que se formam em volta do ânodo. [8]

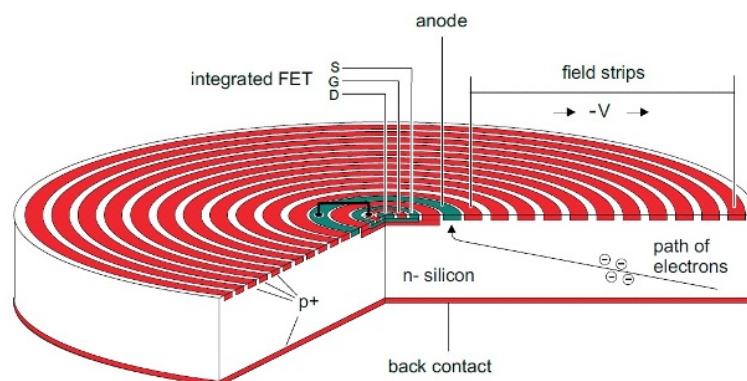


Figura 3.1: Esquema de um SDD [7]

Os elétrodos criam um campo elétrico que guia os elétrões até à zona central do SDD, onde são coletados pelo ânodo. A intensidade de sinal no pré-amplificador é reduzida devido à disposição dos elétrodos, reduzindo o ruído eletrónico. Consequentemente, a filtragem de elétrões é menor o que resulta numa taxa de contagens mais elevada. [7]

O SDD do tornado tem uma resolução em energia para o Mn- $K_{\alpha}$  de 140 eV para um área sensível de 30 mm<sup>2</sup>, sendo a sua taxa de contagens superior a 200 kcps.[7]

Tanto o tubo, como o detetor são arrefecidos por uma célula de Peltier.[7]

Para melhorar os limites de deteção, para uma dada gama de energia, o M4 Tornado tem um conjunto de filtros. Estes podem ser colocados entre o tubo e a amostra, com o intuito de atenuar a radiação de fundo na zona do espectro pretendida.

Por se querer estudar a possível existência de metais pesados nas amostras, foi utilizado apenas o filtro de AlTiCu (alumínio 100  $\mu$ m, titânio 50  $\mu$ m e cobre 25  $\mu$ m) por reduzir o fundo na gama de energias pretendida ( $\sim$ 4 a  $\sim$ 12 keV).[18]

A montagem experimental desta geometria encontra-se ilustrada na Figura 3.2.

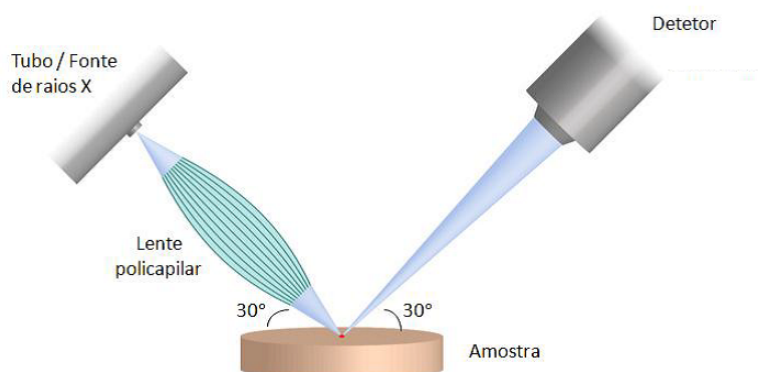


Figura 3.2: Esquema de um espectrómetro com geometria convencional de micro feixe [7]

A análise pode ser feita em vácuo, de modo a diminuir a atenuação dos elementos mais leves, e de menor energia, no ar. Para além de análise pontual/área, este espectrómetro

permite realizar mapeamentos da distribuição dos elementos traço ao longo da amostra. Para o mapeamento ser possível, a amostra tem de ser plana e lisa.[7]

### 3.2 Geometria Tri-axial

Os espectrómetros de geometria Tri-axial, são caracterizados por terem, um alvo secundário de um elemento puro, que é colocado entre o tubo de raios-x e a amostra de modo a formarem três eixos ortogonais. A utilização deste alvo secundário, permite, por polarização, uma redução significativa da radiação de fundo. Por outro lado, teremos como fonte excitadora da amostra, apenas as riscas características do alvo secundário possibilitando uma radiação quase monocromática.[19]

O tubo de raios-x, com um ânodo de W, produz um feixe primário que passa pela janela lateral de Be, posicionada à saída do tubo. O feixe de raios-x chega ao alvo secundário de Mo na direção do eixo dos zz, após atravessar um filtro de prata, o qual absorve as baixas energias do *Bremsstrahlung* do espectro. A radiação característica do alvo secundário é colimada segundo o eixo dos yy até à amostra perdendo-se a componente yy do *Bremstrahlung* do tubo. A radiação característica da amostra é colimada segundo o eixo dos xx até ao detetor de Si(Li) perdendo-se desta forma a componente segundo xx do *Bremstrahlung* do tubo. Os dois colimadores de prata têm como função definir a direção do feixe secundário que chega à amostra e a direção do feixe que é detetado. [20]

Com esta geometria ortogonal Tri-axial, ilustrada na Figura 3.3, obtém-se um espectro praticamente sem fundo, com as riscas características da amostra e as riscas de dispersão do material do alvo secundário, aumentando a sensibilidade e melhorando os limites de deteção.

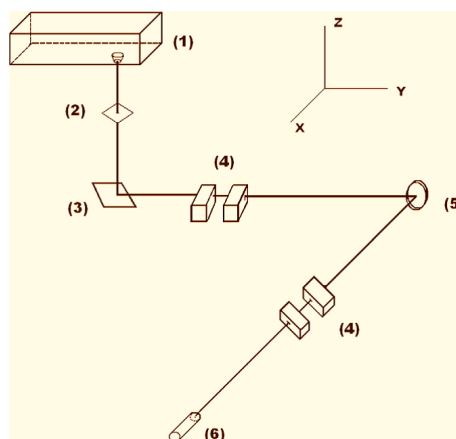


Figura 3.3: Esquema da montagem de EDXRF com geometria Tri-axial: (1)Tubo de raios-x,(2) Filtro de prata, (3) Alvo secundário de Mo, (4) Colimadores, (5) Amostra, (6) Detetor de Si(Li). [20]

O detetor utilizado é composto por Si dopado com Li. Este tem uma área ativa de 33

mm<sup>2</sup> e uma janela de Be com 8  $\mu$ m de espessura. Estes detetores são arrefecidos a azoto líquido (77 K), o que permite detetar fótons com altas energias e com boa resolução em energia. Já a taxa de contagens é baixa e a resolução em energia é de 130 eV nos 5,9 keV.[20] O sistema Tri-axial apresenta várias vantagens. Aumenta a sensibilidade do aparelho e reduz a radiação de fundo. Por esta razão, torna-se possível a identificação de elementos traço, em menores concentrações na amostra, tornando mais viável a caracterização quantitativa da amostra. [20]

## MÉTODOS QUANTITATIVOS

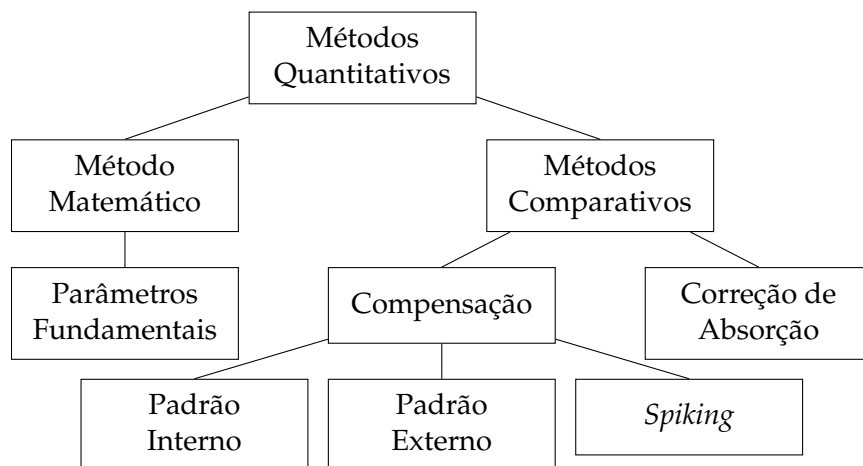
Em espectrometria de fluorescência de raios-x, existem diversos métodos de quantificação. Quantificar os elementos traço em fluorescência de raios-x (*X-ray fluorescence*) (XRF) não é uma tarefa trivial, tornando-se muitas vezes um exercício complexo devido à dificuldade em corrigir os efeitos de matriz de absorção e reforço.[21]

Para os resultados serem fidedignos, as amostras devem ser o mais homogêneas possível. Os métodos quantitativos dividem-se em dois grandes grupos, os métodos matemáticos e os métodos comparativos.

O método matemático mais popular é o método dos parâmetros fundamentais. Os métodos comparativos dividem-se em, métodos de compensação (Padrão externo, padrão interno e adição (*spiking*)) e correção de absorção. [22]

A figura 4.1 exibe um fluxograma que descreve os diferentes métodos existentes.

Figura 4.1: Fluxograma dos diversos métodos quantitativos existentes



No decorrer deste trabalho serão apenas descritos com detalhe os mais comuns/utilizados.

## 4.1 Efeitos de Matriz

Em espectrometria XRF, são denominados efeitos de matriz, os fenómenos de atenuação dos raios-x característicos e alguns elementos presentes na própria amostra e consequente sobrevalorização por reforço dos raios-x característicos de outros elementos.[23]

As absorções primária e secundária ocorrem quando os elementos da amostra absorvem a radiação primária e característica, respetivamente.[23]

Quando os elementos da matriz emitem radiação característica de energia ligeiramente superior à energia de absorção do elemento analisado, este elemento é excitado emitindo a radiação característica para além da energia proveniente do tubo de raios-x. Este processo é denominado fluorescência secundária.[23]

Os efeitos de absorção e reforço são ilustrados no gráfico da Figura 4.2. Como exemplo usam-se compostos binários de FeMn, FeCr e FeNi, em que o Fe é apresentado com a mesma concentração para todos os compostos. Quando os efeitos da matriz são negligíveis ou constantes, verifica-se uma relação linear entre a intensidade da radiação e a fração molar da amostra (curva A). Na curva B, a intensidade do Fe vai diminuir porque a energia característica do Fe é superior à energia de ionização do Cr. Deste modo, o Cr é ionizado pela radiação característica do Fe, verificando-se uma atenuação deste e consequente diminuição da intensidade medida. A curva C ilustra o efeito de reforço, no caso da determinação do Fe existente no composto FeNi. Isto acontece porque o Fe tem uma energia de ionização inferior à energia característica do Ni, deste modo, o Fe é ionizado pelo Ni verificando-se a fluorescência secundária. O resultado é uma intensidade do Fe superior à que era esperada. A energia característica do Fe é muito próxima da energia de ionização do Mn, sendo pouco provável a sua ionização. Nesta situação não se verifica fluorescência secundária e a curva D aproxima-se da curva A.[23]

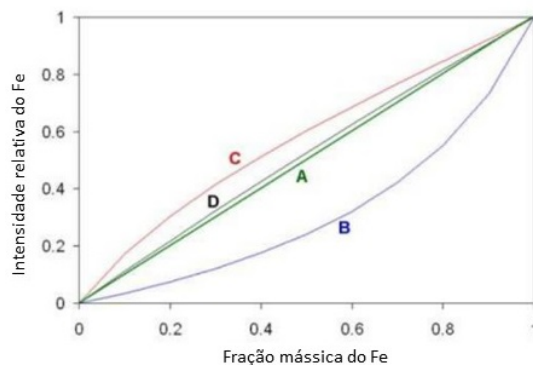


Figura 4.2: Gráfico da variação da intensidade relativa do Fe e a fração mássica do Fe: Curva A-efeitos matriz desprezáveis; B-Matriz FeCr; C-Matriz FeNi; D-Matriz FeMn [23]

## 4.2 Métodos Matemáticos

Os métodos matemáticos, são assim denominados por tomarem em consideração os efeitos matriz em vez de os eliminar ou medir.

### 4.2.1 Parâmetros Fundamentais

O método dos parâmetros fundamentais (PF) é um método iterativo de determinação da composição de uma amostra desconhecida. Inicialmente é assumida uma determinada composição para a amostra, as intensidades teóricas correspondentes a essa composição são comparadas com o espectro experimental. A composição é ajustada até o espectro teórico coincidir com o experimental.

Para a utilização deste método têm de se considerar, diversos aspetos como as condições de medição e a configuração experimental, sendo que estes aspetos se relacionam com a intensidade medida.

A concentração de cada elemento detetado varia proporcionalmente com a intensidade de fluorescência de raios-x.

Os efeitos de outros elementos presentes na amostra podem ser calculados usando parâmetros físicos conhecidos, nomeadamente o coeficientes de absorção fotoelétrica, coeficientes de atenuação mássico, probabilidades de transições, rendimentos de fluorescência, entre outros, valores estes que se encontram em bases de dados científicas.

Este método utiliza a equação de Sherman, para proceder à quantificação dos elementos presentes na amostra, considerando a fluorescência primária e secundária.[23]

Em 1955, Sherman propôs uma equação para calcular a intensidade de fluorescência de raios-x,  $I_i$ , numa amostra, com uma espessura  $x$ , com composição conhecida. Mais tarde, Shiraiwa e Fujino melhoraram essa equação, dando origem à eq.4.1.[23]

$$I_i = \frac{d\Omega}{4\pi \sin\phi_1} Q_i q_i W_i \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{edge}} \tau_i(\lambda) I_0(\lambda) \frac{1 - \exp[-\chi(\lambda, \lambda_i) \rho x]}{\chi(\lambda, \lambda_i)} (1 + \sum_j W_j S_{ij}) d\lambda \quad (4.1)$$

Na eq.4.1,  $d\Omega$  representa o ângulo sólido;  $i, j$  são os índices do elemento analisado e do elemento da matriz;  $Q_i$  é a sensibilidade do espectrómetro para a radiação característica em análise  $i$ ;  $W_i, W_j$  são frações mássicas;  $\lambda_{min}$  e  $\lambda_{edge}$ , o comprimento de onda mínimo corresponde à energia máxima do espectro e o comprimento de onda  $edge$  é o comprimento de onda da descontinuidade de absorção de um dado elemento;  $\tau_i(\lambda)$  é o coeficiente de absorção fotoelétrico do elemento  $i$  em análise, em função do comprimento de onda da radiação primária  $\lambda$ ;  $I_0(\lambda)$  é a intensidade da radiação primária;  $\rho$  representa a densidade da amostra;  $q_i$  é a sensibilidade do método para o elemento  $i$ , é aqui que entram as secções eficazes, os rendimentos de fluorescência, descontinuidades de absorção, etc.;  $\chi(\lambda, \lambda_i)$  é o coeficiente de atenuação mássico total da amostra para a radiação incidente;  $\phi_1$  é o ângulo de incidência e  $S_{ij}$  representa o termo de reforço para o elemento  $j$  da matriz.

Caso se conheça a matriz da amostra em estudo, esta equação possibilita o cálculo da

intensidade de fluorescência. Para tal, é necessário ter conhecimento de todos os parâmetros físicos (parâmetros fundamentais) existentes na equação. O método dos parâmetros fundamentais tem servido de base para o estudo e desenvolvimento de métodos para análise de amostras de interesse geológico, biológico, ambiental e agronómico, tendo a vantagem de necessitarem de um pequeno número de padrões. [24]

### 4.3 Métodos Comparativos

Os métodos comparativos fazem uma aproximação do efeito matriz de um ponto de vista global. Estes métodos são mais adequados para análises parciais, por exemplo a determinação de um ou dois elementos de uma amostra.[22]

#### 4.3.1 Métodos de Compensação

Enquanto as correções matemáticas podem ser visualizadas como séries de efeitos individuais. A principal característica dos métodos comparativos é que não necessitam de fazer uma análise completa à amostra, não deixando de ser preferível a análise a um ou poucos elementos.[22]

##### 4.3.1.1 Método do padrão externo

O método do padrão externo ou método de comparação direta é adequado para analisar amostras, em que a matriz se assume constante em comparação com a amostra padrão. Este método consiste em determinar a concentração dos vários elementos da amostra, comparando a intensidade de fluorescência com a de padrões do mesmo tipo. Tais comparações só se justificam se o elemento estiver associado a uma matriz uniforme que dê uma curva de intensidade como uma função da concentração.[22]

De um ponto de vista prático, calcula-se uma curva de calibração de intensidades em função de energias. A curva de calibração para um elemento numa matriz conhecida pode ser usada para calcular a curva de calibração do mesmo elemento numa outra matriz.[22] A intensidade da radiação dispersa é inversamente proporcional ao coeficiente de atenuação mássico dos elementos da amostra.[13]

O coeficiente de atenuação mássico é um parâmetro que descreve a interação de radiação eletromagnética de alta energia com a matéria, através da absorção fotoelétrica, da dispersão de Compton e da dispersão de Rayleigh.[25]

Este coeficiente, fornece uma grande variedade de informações sobre as propriedades fundamentais da matéria a nível atómico e molecular.[25]

Os coeficientes de atenuação mássicos de dois comprimentos de onda diferentes são virtualmente proporcionais, independentemente da composição da matriz. Isto diz nos



que não há descontinuidades de absorção significativas entre os dois comprimentos de onda considerados.

Uma das vantagens deste método é permitir a determinação de elementos com concentração baixa na amostra.

Este método, é adequado quando as variações da matriz em estudo são pequenas, por exemplo, nos casos de análises de controle.[22]

Gonzalez-Fernandez *et al.* [26] usaram diversos padrões externos para corrigir a intensidade do pico de Pb dividindo a mesma pela intensidade do pico de Compton.

Discenza *et al.* [27] utilizaram padrões externos para a determinação de chumbo e arsênio em solos. As amostras foram usadas secas e moídas tendo sido recolhidas da zona metropolitana de Nova Iorque. Para a análise foi utilizado um espectrômetro de fluorescência de raios-x portátil.

Trunova *et al.* [28] usaram o método do padrão externo com correção de absorção para fazer análise de Fluorescência de raios-x por radiação de sincrotrão (Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence) (SRXRF) em tecidos biológicos. Eles concluíram que este método permite obter resultados quantitativos bastante precisos mesmo com muitas diferenças nas propriedades de absorção e dispersão das amostras de teste e de referência. As desvantagens deste método prendem-se com a necessidade de efetuar medidas preliminares do coeficiente de atenuação mássico dos materiais de teste e dos erros que podem ocorrer na extrapolação das dependências abaixo do intervalo de energias medidas experimentalmente. Horntrich *et al.* [29] desenvolveram uma investigação sobre a distribuição e homogeneidade dos elementos em amostras Fluorescência de raios-x por reflexão total (*Total Reflection X-ray Fluorescence*) (TXRF) usando micro fluorescência de raios-x com feixe de radiação de sincrotrão (*Synchrotron -radiation-induced micro X-ray fluorescence*) (SR-micro-XRF) para validar o uso dos padrões internos e melhorar a quantificação utilizando o método dos padrões externos. Os autores, concluíram que para amostras de Ni, o método dos padrões externos é possível de usar a partir dos 150 ng de Ni.

#### 4.3.1.2 Método do padrão interno

Ao contrário do que acontecia no método do padrão externo, este método pressupõe a utilização de produtos químicos. Deste modo, a amostra é misturada com uma quantidade fixa de um elemento, o padrão interno, que apresente propriedades de fluorescência semelhantes aos elementos presentes na amostra.[22] A proporção da intensidade do elemento da amostra com a intensidade do padrão interno deve ser independente da matriz e proporcional à concentração de ambos os elementos.[22] Para a escolha do padrão interno têm de se considerar dois aspetos muito relevantes:

- i O elemento adicionado não pode existir na amostra
- ii O elemento em análise e o padrão interno devem ser afetados do mesmo modo por todos os elementos da amostra, que na maioria dos casos requer que ambas as

radiações fluorescentes tenham praticamente o mesmo comprimento de onda.

Este método apresenta como vantagens a possibilidade de obter resultados com grande precisão, é aplicável a uma vasta gama de concentrações dadas as duas linhas com intensidades da mesma ordem de grandeza e as razões de intensidade são pouco afetadas por variações nas condições experimentais. No entanto, encontrar um padrão interno adequado é uma tarefa complicada por ser difícil satisfazer as condições da escolha do padrão interno mencionadas em cima. A introdução do elemento padrão pode causar problemas na determinação de outros elementos na amostra, tais como, efeitos matriz e sobreposição de linhas.[22]

Devida a esta última condicionante, este método é normalmente utilizado para determinar apenas concentrações de um elemento presente na amostra em estudo.[22]

Chiwesheet *al.* aplicaram cinco padrões internos diferentes (Sc, Co, Y, In e La) para o estudo de metais preciosos como a platina e o ouro. O objetivo do estudo de Chiwesheet *et al.* era determinar o padrão interno ideal para quantificar os metais preciosos e para explicar porque razão uns padrões são mais bem sucedidos que outros para a quantificação dos metais.[30] Estes metais, principalmente o grupo da platina, são extremamente importantes e úteis nos tempos que decorrem. Eles são usados para reduzir a poluição.[30] O método do padrão interno também pode ser utilizado para o estudo de medicamentos. Mzyket *al.* ao estudarem comprimidos que continham revestimento de celulose, utilizaram Sr como padrão interno para simplificar a análise quantitativa de fluorescência de raios-x em amostras em pó. Os autores observaram que a adição de carbonato de estrôncio ( $SrCO_3$ ) como padrão interno, era o mais apropriado para efetuar a análise por fluorescência de raios-x dispersiva em comprimento de onda (*Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence*) (WDXRF), para corrigir os efeitos matriz e os efeitos do tamanho do granulado da amostra.[31]

#### 4.3.1.3 Método de *Spiking*

O método de *Spiking* ou adição, consiste em introduzir na amostra em estudo, o elemento que pretendemos obter a concentração, em concentrações conhecidas. É feita uma comparação da intensidade de fluorescência antes e depois da adição do elemento em estudo, sendo usadas para obter a concentração através de cálculos. Este método permite fazer uma compensação do efeito matriz.[22]

Este método deve ser considerado quando se pretende determinar concentrações de um elemento em amostras complexas. Ao contrário do que acontece no método do padrão interno, este pode ser utilizado em qualquer tipo de matriz.[22]

Este método só permite encontrar elementos com baixa concentração na amostra. A difícil preparação da amostra e a dificuldade em obter concentrações conhecidas, fez com que este método seja pouco usado.[22] Este método, foi aplicado num estudo realizado por Stankey *et al.* [32] que visava avaliar a técnica de XRF como método para uma rápida

análise para determinação de sódio no queijo. Neste estudo, para quantificar o sódio existente na amostra, foi feita uma calibração com padrões de queijo *Spiked* com cloreto de sódio (NaCl), com concentrações de Na entre 0-4%, os autores revelam que a preparação das amostras para este método não é complexa.

Chan et al. [33] utilizaram o método de *Spiking* para determinar a quantidade de cálcio em leite em pó utilizando XRF. Os autores concluem neste estudo a superioridade do método da adição relativamente aos dos padrões externos, que será abordado mais a diante.

### 4.3.2 Método de Correção de Absorção

Dentro do Método de Correção de Absorção destaca-se o método de radiação dispersa. Neste método, a intensidade de radiação fluorescente e de radiação primária dispersa pela amostra a um comprimento de onda próximo da linha de fluorescência, são afetados da mesma forma pela absorção da amostra. Assim sendo, a razão das intensidades é praticamente independente da matriz. Esta razão é insensível a algumas variáveis, tais como as condições de excitação da amostra, travagem e variações das características físicas na amostra, tais como, o tamanho das partículas ou o pó compactado. Este método é apenas semi-quantitativo. Como este método não compensa os efeitos de reforço, é preferencialmente aplicável a elementos de Z maior que os Z dos elementos da Matriz. A radiação dispersa tem de ser conhecida com precisão suficiente, o que significa que as medidas têm de ser feitas com os picos de Compton e Rayleigh provenientes do Tubo de raios-x. Estas condições podem ser encontradas quando se quer analisar concentrações baixas de elementos pesados em matrizes leves, tais como, materiais biológico e geológicos. A figura 4.3 refere-se a um estudo que visava determinar a intensidade de Sr em amostras geológicas com uma grande variedade de elementos traço. Como se pode ver na figura 4.3, quando é feito o ajuste da reta com a correção de Compton, a intensidade do elemento na amostra e a concentração variam linearmente 4.3(b), contrariamente aquilo que se verifica quando não é aplicada a correção 4.3(a).[13]

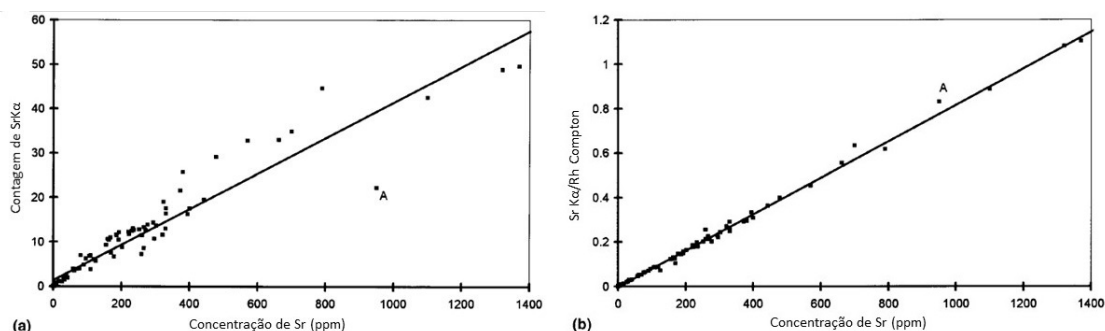


Figura 4.3: Figura adaptada de [13] (a) Taxa de contagem do SrK $\alpha$  em função da concentração de Sr (b) razão entre a taxa de contagem da radiação SrK $\alpha$  e do pico de Compton está em função da concentração de Sr.

Zeynepet *al.* [34] usaram o método da razão do pico de dispersão, conhecido também por método do padrão interno com dispersão de raios-x, para fazer a análise quantitativa. Para isso, obtiveram as curvas de calibração da razão dos picos de intensidade dos elementos da amostra com os picos de dispersão mais intensos Rayleigh com Compton R/C. Os picos da razão de Compton foram calculados a partir das áreas do pico de Compton. As curvas de calibração foram definidas como concentração em função da razão das intensidades dos picos característico com o de Compton.

Pereira *et al.* [25] desenvolveram um método para corrigir a radiação absorvida a baixas energias (<30 keV) aplicada a matrizes biológicas. Este método baseia-se na razão dos picos de Rayleigh e Compton e no número atômico efetivo. Para a validação do método foi utilizado o Método de Transmissão, que não será abordado no decorrer deste trabalho. Os resultados experimentais estavam em concordância com os do método de validação, demonstrando que esta correção é adequada para amostras biológicas.

Gonzalez-Fernandez *et al.* [26] desenvolveram um estudo com o objetivo de analisar chumbo em resíduos de trituração automóvel, recorrendo à técnica de EDXRF para efetuar a análise e ao método quantitativo de correção das intensidades pelo pico de Compton. Este método foi utilizado para compensar os efeitos matriz. Os autores referem que o uso adequado da correção através das razões de intensidade e Compton (Elemento/Compton) permite uma boa linearidade de calibração dos elementos pesados abaixo do valor atômico médio da composição química que assim permite a quantificação de amostras de matrizes complexas.[26]

Reynalds [35] desenvolveu um trabalho onde pretende estimar o coeficiente de absorção mássico pela dispersão de Compton. O autor pretende fazer essa estimativa fazendo correções da matriz a elementos traço analisados por XRF. O autor refere que a principal vantagem dos métodos de análise de elemento traço por fluorescência de raios-x é o facto de se poder estudar vários elementos e o facto de se obterem expressões simples, por exemplo, se a matriz é constante é encontrada uma relação linear entre a concentração do elemento traço e a intensidade da radiação. Neste estudo, a correção usada foi a do pico de intensidade de Compton pelo de Rayleigh.[35]

## METODOLOGIA

### 5.1 Procedimento experimental

#### 5.1.1 Preparação das amostras

As amostras utilizadas neste trabalho, anteriores ao séc.XXI, foram cedidas pelo museu de arqueologia de Almada e as do séc.XXI foram recolhidas no estuário do Tejo. As conchas foram imersas em água para facilitar a remoção das areias e dos restos do molusco. Ao fim de cerca de 20 min as amostras foram esfregadas e passadas por água corrente.

Para serem analisadas, as amostras foram moídas num almofariz até se obter um pó muito fino e homogéneo. De seguida o pó foi prensado em pastilhas com 15 mm de diâmetro, sem recorrer a qualquer tratamento químico. Para o efeito foram aplicados  $1,7 \times 10^9$  Pa de pressão e quando a pastilha ficou pronta foi colada num folha de *Mylar* e introduzida num porta-amostras. No fim de cada preparação de amostra, todo o material foi desinfetado com álcool. Por fim, a amostra está pronta para ser analisada.[20]

No caso dos padrões, estes já estão na forma de pó, pelo que o processo a partir deste ponto é igual ao que foi aplicado às amostras.

#### 5.1.2 Análise das amostras

Começou-se por analisar diversas espécies de bivalves, figura 5.1, porém optou-se por considerar apenas as conchas de ameijoas, por serem as únicas que se encontravam representadas em todas as épocas.



Figura 5.1: Fotografia de várias espécies de conchas: 1- *Crassostrea Gigas* (ostra); 2- *Donax* (conquilha); 3- *Mytilus edulis* (mexilhão); 4- *Cerastoderma edule* (berbigão); 5- *Spisula solida* (ameijoia) e 6- *Concholepas concholepas* (caracol do mar).

Todos os padrões e amostras foram analisados nos equipamentos M4Tornado e no sistema Tri-axial, figuras 5.2 e 5.3.



Figura 5.2: M4Tornado da Bruker - equipamento de EDXRF com geometria convencional

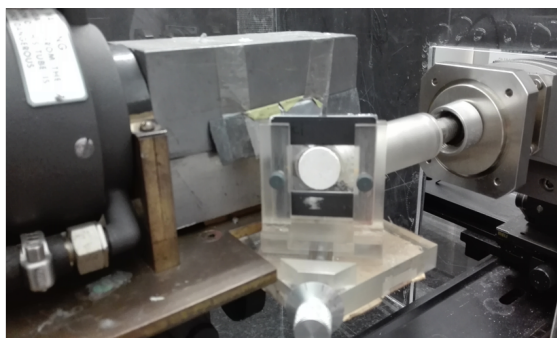


Figura 5.3: Equipamento de EDXRF com geometria Tri-axial

No sistema Tri-axial, o gerador de alta tensão foi utilizado com 50 kV de tensão e 20 mA de corrente, e tempo de aquisição de 1000 s. Este processo foi repetido para todas as amostras e padrões.[19]

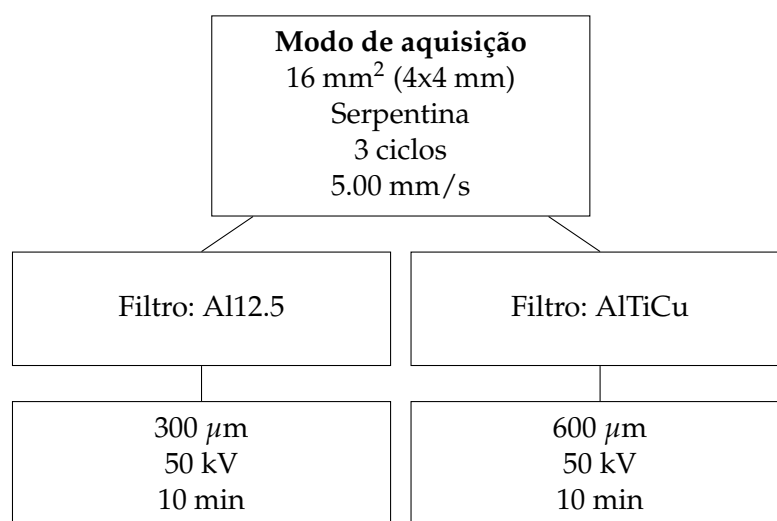
Para o M4Tornado, aplicou-se uma tensão de 50 kV ao gerador de alta tensão e uma corrente de 300  $\mu\text{A}$  ou de 600  $\mu\text{A}$ , conforme o filtro escolhido para a análise. Para a aquisição com o filtro de Al12.5 aplicou-se uma corrente de 300  $\mu\text{A}$  e para o filtro de AlTiCu 600  $\mu\text{A}$ . O sistema Tri-axial, está dimensionado para analisar amostras com o formato que foi explicado na Preparação das amostras, ao contrário do equipamento M4Tornado, que é constituído por uma plataforma ajustável tanto na vertical como na horizontal, que



permite selecionar a zona da amostra que queremos estudar. Este equipamento permite também escolher a área a analisar. Para as nossas amostras escolheu-se uma área de  $16 \text{ mm}^2$  ( $4 \times 4 \text{ mm}^2$ ) e não um ponto, porque as pastilhas não são homogêneas e fazendo uma área temos uma melhor aproximação da composição global. Escolheu-se o modo de aquisição serpentina e uma taxa de aquisição de  $5,00 \text{ mm/s}$ . O modo serpentina adquire fazendo um varrimento de toda a área da amostra escolhida num movimento em serpentina, i.e., aos S's.

Na figura 5.4 está representado um esquema com os parâmetros de aquisição utilizados pelo M4Tornado. Foi escolhida uma área de  $16 \text{ mm}^2$  ( $4 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ ) e a análise foi feita usando o varrimento em serpentina. Cada análise foi feita em 3 ciclos a um taxa de aquisição de  $5,00 \text{ mm/s}$ . Para cada amostra foram feitas duas medições uma usando o filtro de Al12.5 e outra com o filtro de AlTiCu. Para cada filtro foram escolhidos os parâmetros apresentados na figura 5.4

Figura 5.4: Esquema explicativo do protocolo de aquisição usado pelo M4Tornado.



### 5.1.3 Tratamento de dados

Após a preparação dos padrões, estes são analisados nos espectrómetros de fluorescência de raios-x, que devolvem um espectro de intensidade em função da energia.

O espectro é tratado no *software* OriginPro<sup>®</sup>, para se remover o fundo e ajustar os picos, por forma a calcular as áreas dos diversos picos. O ajuste dos picos recorre ao uso de curvas Gaussianas, sendo preciso fazer o ajuste da largura a meia-altura e do máximo da função, para cada pico. Para o ajuste do fundo, foi criada uma linha de base, que ajusta a base de todos os picos.

Com a linha de base definida e os picos ajustados, o programa faz o cálculo das áreas entre a linha de base e a curva gaussiana.

Existem outros softwares, como o Winaxil<sup>®</sup>, que fazem o ajuste do espectro, mas são

incapazes de ajustar com o Compton e o Rayleigh, daí se ter usado o OriginPro<sup>®</sup>.

A figura 5.5 pertence ao padrão caprine04 obtido pelo equipamento Tornado e a figura 5.6 pelo Tri-axial. A linha verde corresponde ao ajuste da *baseline* e a linha vermelha corresponde ao ajuste feito aos picos presentes nos espectros.

Como se pode observar nas figuras 5.5 e 5.6 também se consegue fazer ajustes dos picos que estão sobrepostos.

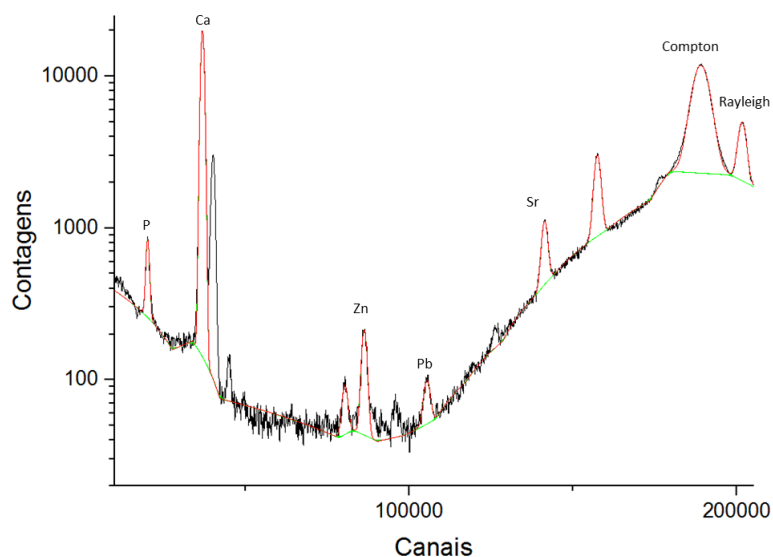


Figura 5.5: Espectro do padrão caprine04 obtido com o tornado, onde a linha de base é representada pela linha verde e o ajuste dos picos pela linha vermelha

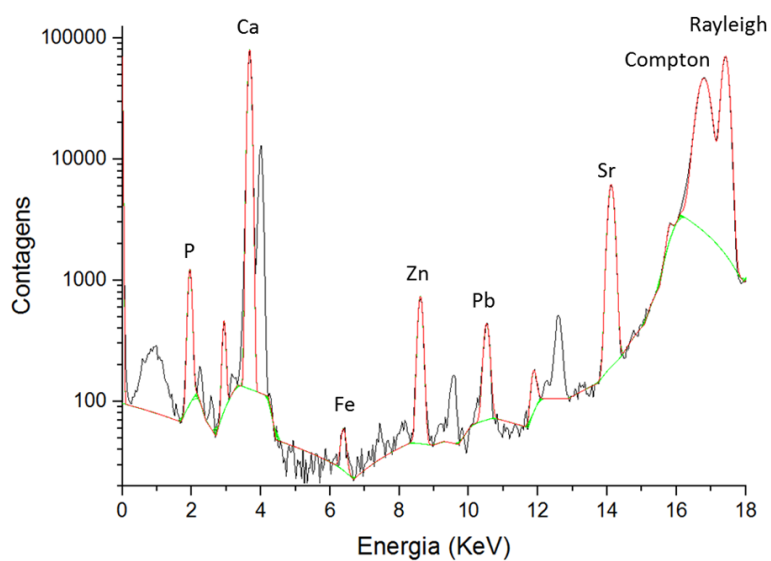


Figura 5.6: Espectro do padrão caprine04 obtido com o Tri-axial, onde a linha de base é representada pela linha verde e o ajuste dos picos pela linha vermelha



## 5.2 Métodos quantitativos usados

### 5.2.1 Método dos parâmetros fundamentais

O método dos parâmetros fundamentais, está implementado nos *softwares* de análise e quantificação dos equipamentos que foram utilizados. Para a análise quantitativa é apenas necessário escolher os elementos que estamos interessados, não sendo preciso recorrer a padrões certificados. Para este método, os padrões servem apenas para a validação do método.

O *software* do M4Tornado, permite escolher a matriz das nossas amostras, como sendo carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ).

### 5.2.2 Método comparativo com correção de intensidades

As amostras e os padrões não apresentam exatamente a mesma matriz, no entanto, apresentam uma matriz semelhante, de hidroxiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) em vez de  $\text{CaCO}_3$ . Assim sendo, é necessário utilizar métodos de correção das intensidades características baseados nos picos de dispersão com o Compton, com a razão Rayleigh-Compton (R/C) e com a razão Compton-Rayleigh (C/R).

Para a quantificação dos elementos traço existentes nas amostras foram utilizados o método dos parâmetros fundamentais e um novo método, adaptado, que combina a utilização de padrões externos recorrendo a correções com os picos de dispersão, para a correção dos efeitos matriz.

O método dos padrões externos, ou método comparativo, apoia-se no uso de padrões certificados, como já foi explicado no capítulo 4.

Os padrões devem ser escolhidos conforme a matriz da amostra e tendo em atenção os elementos traço que estamos interessados em estudar.

Para a implementação deste método utilizaram-se os seguintes padrões de osso:

- NYS RM 05-01 Lead in Bovine Bone (bovine01)
- NYS RM 05-02 Lead in Bovine Bone (bovine02)
- NYS RM 05-03 Lead in Caprine Bone (caprine03)
- NIST-1486 (Bone Meal)
- NIST-1400 (Bone Ash)

As fichas com os valores certificados dos vários padrões encontram-se em Anexo.

Para a correção com os picos de dispersão, utilizam-se os valores das áreas obtidos no OriginPro<sup>®</sup> e são construídas curvas de calibração da intensidade

Nas figura 5.7 a 5.11, estão representadas as regressões lineares para o vários elementos em estudo (Ca, Fe, Zn, Pb, Sr), aplicando a correção da área com o pico de Compton.

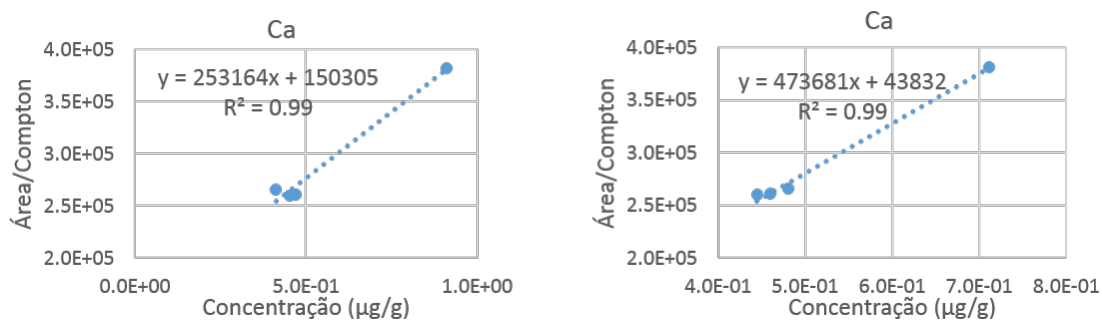


Figura 5.7: Regressões linear para o Ca aplicando a correção com o pico de Compton. Os gráficos do lado direito correspondem aos dados adquiridos com o Tornado e os do lado esquerdo pelo Tri-axial

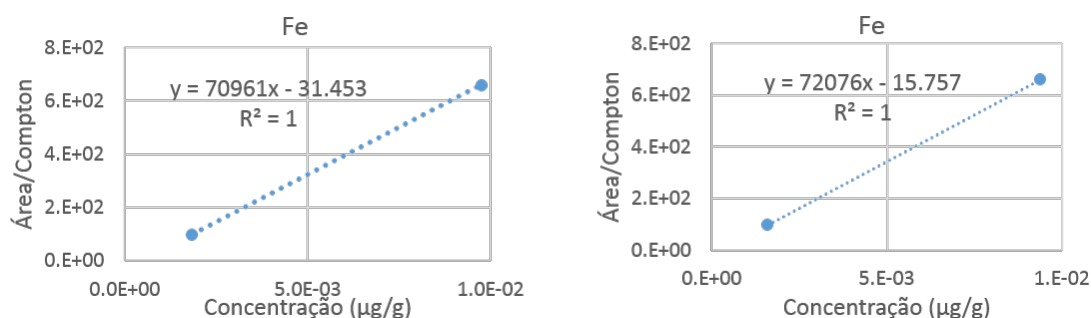


Figura 5.8: Regressões linear para o Fe aplicando a correção com o pico de Compton. Os gráficos do lado direito correspondem aos dados adquiridos com o Tornado e os do lado esquerdo pelo Tri-axial

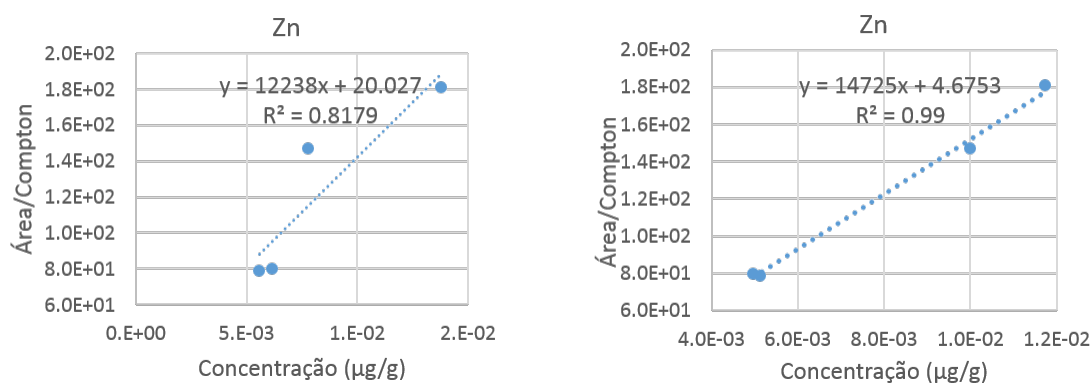


Figura 5.9: Regressões linear para o Zn aplicando a correção com o pico de Compton. Os gráficos do lado direito correspondem aos dados adquiridos com o Tornado e os do lado esquerdo pelo Tri-axial

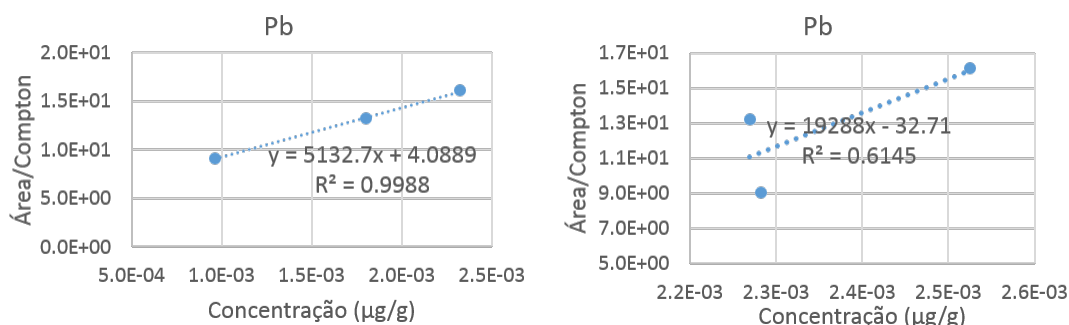


Figura 5.10: Regressões linear para o Pb aplicando a correção com o pico de Compton. Os gráficos do lado direito correspondem aos dados adquiridos com o Tornado e os do lado esquerdo pelo Tri-axial

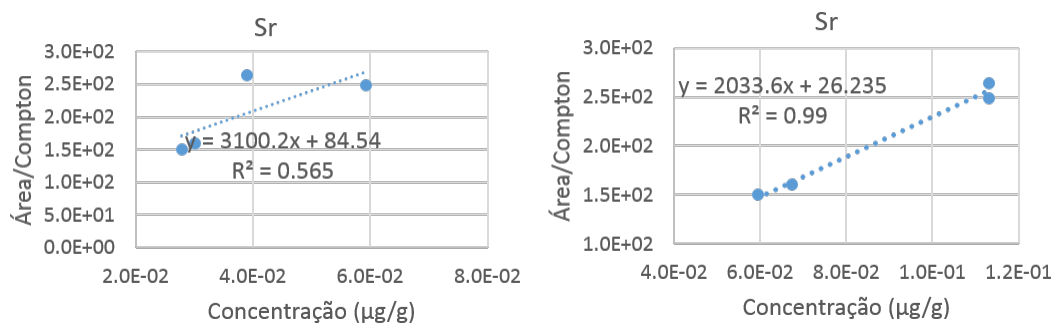


Figura 5.11: Regressões linear para o Sr aplicando a correção com o pico de Compton. Os gráficos do lado direito correspondem aos dados adquiridos com o Tornado e os do lado esquerdo pelo Tri-axial

### 5.2.3 Validação do método

Um sexto padrão, NYS RM 05-04 lead in Caprine Bone, ou caprine04, foi utilizado, para validar o método quantitativo.

Nas tabelas 5.1 e 5.2, estão representados os resultados das concentrações para as amostras analisadas no M4Tornado e no Tri-axial, respetivamente. Nas tabelas, para além dos resultados do Nosso método, também estão os resultados obtidos pelo método dos parâmetros fundamentais.

Comparando todos os valores das concentrações obtidas com os valores certificados, praticamente todos os valores correspondem à mesma ordem de grandeza e por isso podemos considerar que o Nosso método é válido para quantificar as amostras. A escolha do melhor método quantitativo, para as nossas amostras, será feita no capítulo de Análise de Resultados, Capítulo 6.

Tabela 5.1: Quantificação do padrão caprine04 obtido no M4Tornado ( $E=10^\circ$ )

Caprine 04											
Tornado											
	Certificado ( $\mu\text{g/g}$ )	PF ( $\mu\text{g/g}$ )	$\Delta\%$	Compton ( $\mu\text{g/g}$ )	$\Delta\%$	C/R	$\Delta\%$	R/C ( $\mu\text{g/g}$ )	$\Delta\%$	S/ Correção ( $\mu\text{g/g}$ )	$\Delta\%$
Ca	2.64E5	2.6E5 $\pm$ 7E4	2	2.6E5 $\pm$ 2.6E4	2	2.7E5 $\pm$ 2.7E4	2	2.8E5 $\pm$ 2.8E4	6	2.6E5 $\pm$ 2.6E4	2
Zn	8.1E1	9.1E1 $\pm$ 1E-2	12	9E1 $\pm$ 9	11	9E1 $\pm$ 9	11	1.1E2 $\pm$ 1.1E1	36	8E1 $\pm$ 8	1
Pb	3.15E1 $\pm$ 7.00E-1	3.8E1 $\pm$ 1.0E-3	21	1.4E1 $\pm$ 1.0	57	1.4E1 $\pm$ 1.0	56	1.4E1 $\pm$ 1.0	56	1.4E1 $\pm$ 1.0	56
Sr	1.5E2	1.34E2 $\pm$ 2.00E-2	11	1.6E2 $\pm$ 1.6E1	7	1.6E2 $\pm$ 1.6E1	7	2E2 $\pm$ 2E1	33	1.5E2 $\pm$ 1.5E1	0

Tabela 5.2: Quantificação do padrão caprine04 obtido no Tri-axial ( $E=10^\circ$ )

Caprine 04											
Tri-axial											
	Certificado ( $\mu\text{g/g}$ )	PF ( $\mu\text{g/g}$ )	$\Delta\%$	Compton ( $\mu\text{g/g}$ )	$\Delta\%$	C/R ( $\mu\text{g/g}$ )	$\Delta\%$	R/C ( $\mu\text{g/g}$ )	$\Delta\%$	S/ Correção ( $\mu\text{g/g}$ )	$\Delta\%$
Ca	2.64E5	2.6E5 $\pm$ 2.0E4	2	2.6E5 $\pm$ 2.0E4	2	2.7E5 $\pm$ 2.7E4	2	2.7E5 $\pm$ 2.7E4	2	2.9E5 $\pm$ 2.9E4	10
Zn	8.1E1	8.7E1 $\pm$ 9.0	7	8.8E1 $\pm$ 9.0	9	9.1E1 $\pm$ 9.0	12	1.2E2 $\pm$ 1.2E1	48	100 $\pm$ 10	23
Pb	31.5 $\pm$ 0.7	3.3E1 $\pm$ 4.0	5	3.5E1 $\pm$ 4.0	11	2.1E1 $\pm$ 2.0	33	1.9E1 $\pm$ 2.0	40	2.3E1 $\pm$ 2.0	27
Sr	1.5E2	1.5E2 $\pm$ 2.0E1	0	1.5E2 $\pm$ 1.5E1	0	1.6E2 $\pm$ 1.6E1	7	1.9E2 $\pm$ 1.9E1	27	1.7E2 $\pm$ 1.7E1	13

Para cada método foi calculada a diferença dos valores das concentrações obtidas com o valor das concentrações certificadas. Estes valores estão representados sob a forma de percentagem nas tabelas 5.1 e 5.2.

Olhando para as diferenças ( $\Delta\%$ ), pode-se excluir o método com a correção com a razão do Rayleigh e do Compton e o método que não recorre a correções com os picos de dispersão, por serem os métodos que têm valores mais distantes dos valores certificados.

## 5.2.4 Implementação dos métodos

A figura 5.12 representa um espectro típico das amostras que foram estudadas neste trabalho. Os elementos que foram quantificados foram o Ca, o Fe, o Zn, o Pb e o Sr, que estão indicados nos espectro da figura 5.12.

Substituindo os valores das áreas dos picos, ou o da área com correções dos picos de dispersão, nas regressões lineares 5.7 a 5.11, obtém-se o valor da concentração para cada elemento da amostra.

Podemos verificar que os espectros dos padrões, figuras 5.5 e 5.6, são muito semelhantes aos das amostras, figura 5.12, de um ponto de vista qualitativo.

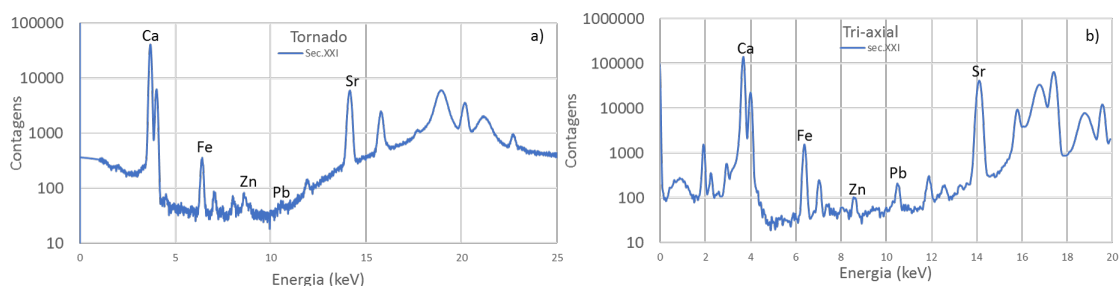


Figura 5.12: Espectros de uma amostra do século XXI adquiridos com os equipamentos a)Tornado e b)Tri-axial.

## ANÁLISE DE RESULTADOS

No capítulo 5, foi feita uma primeira filtragem dos métodos quantitativos, comparando as concentrações obtidas com as certificadas.

Considerando os restantes métodos, para cada elemento foram elaborados dois gráficos de barras. Um para representar os resultados obtidos no Tornado e o segundo pelos espectros adquiridos pelo Tri-axial.

Como já foi referido anteriormente, o cálcio é um elemento da matriz, pelo que não é esperado que varie significativamente ao longo dos séculos. No entanto, olhando para a figura 6.2, pela correção de C/R este elemento varia consideravelmente e na Idade do Bronze apresenta uma incerteza muito elevada.

No apêndice A, estão relacionados os resultados das concentrações do cálcio para o mesmo métodos quantitativo. Comparando a concentração do cálcio usando o método quantitativo dos PF, verifica-se que a diferença de concentrações entre os resultados do Tornado e do Tri-axial ronda os 40%. No caso dos resultados do Tri-axial os valores são demasiado elevados.

No caso dos resultados obtidos pela correção com o Compton, figuras 6.1 e 6.2, os resultados ao longo dos tempos são praticamente constantes e a variação entre os dois equipamentos mantém-se na mesma ordem de grandeza.

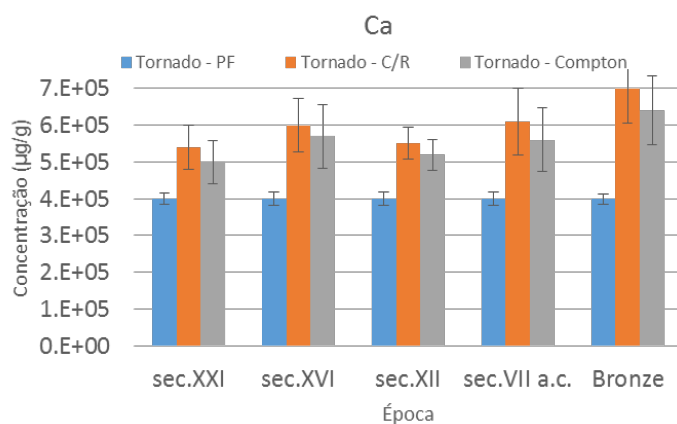


Figura 6.1: Gráfico das concentrações do Ca, obtidas no tornado, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton.

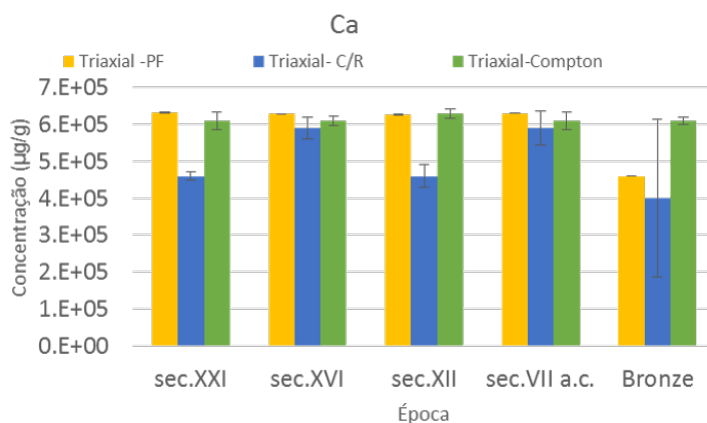


Figura 6.2: Gráfico das concentrações do Ca, obtidas no Tri-axial, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton.

Para o Fe, representado nas figuras 6.3 e 6.4, o método que menos se adequa é o da correção de C/R. No caso dos resultados obtidos pelo Tri-axial, na Idade do Bronze, atendendo à incerteza dos resultados as concentrações não são consideradas. Já nos dados do Tornado, este método parece pouco consistente, pois ao contrário dos PF e da correção com Compton, as concentrações não variam do mesmo modo ao longo dos tempos.

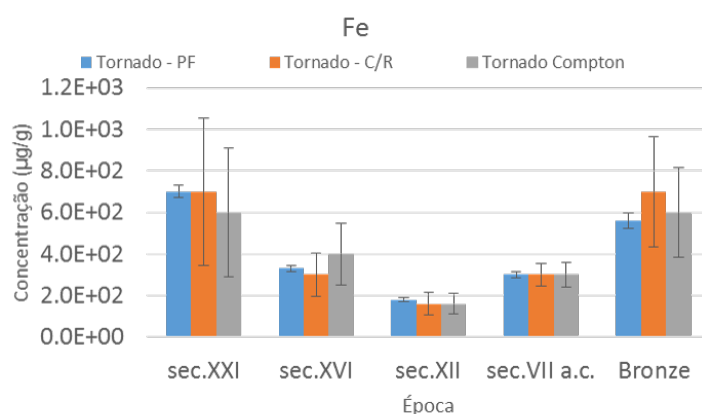


Figura 6.3: Gráfico das concentrações do Fe, obtidas no tornado, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton.

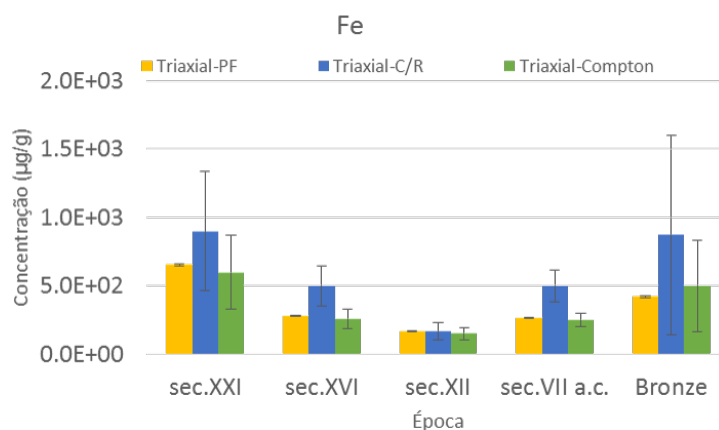


Figura 6.4: Gráfico das concentrações do Fe, obtidas no Tri-axial, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton.

Observando agora os resultados para o Zn, o método dos PF e o método da correção com o Compton apresentam uma grande diferença de concentrações entre os equipamentos. Para os resultados do Tornado, as concentrações rondam os 50 µg/g e para o Tri-axial cerca de 20 µg/g, como se pode observar nas figuras 6.5 e 6.6.

Para os resultados do Tri-axial, todos os métodos apresentam uma concentração inferior na Idade do Bronze comparando com as restantes épocas.

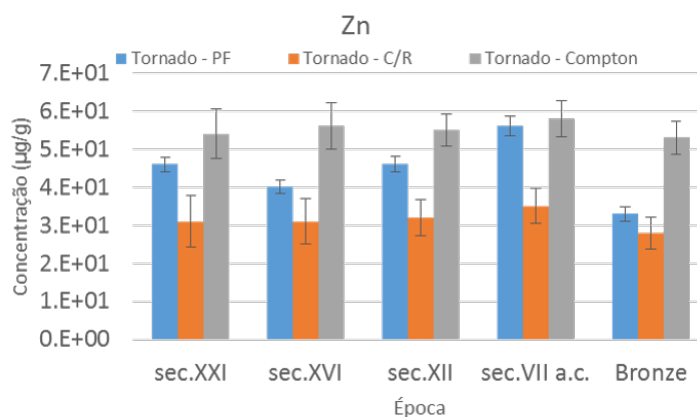


Figura 6.5: Gráfico das concentrações do Zn, obtidas no tornado, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton.

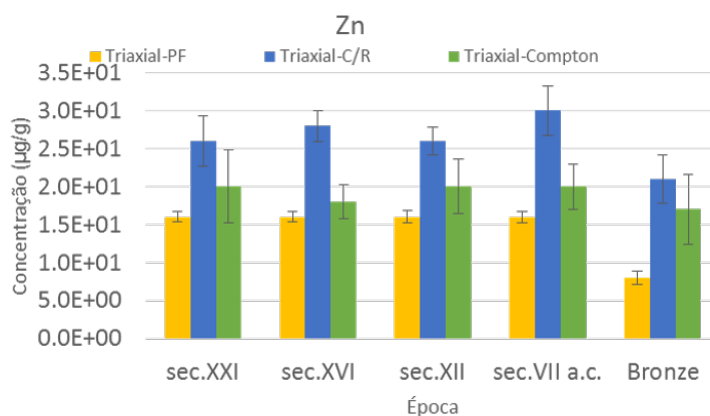


Figura 6.6: Gráfico das concentrações do Zn, obtidas no Tri-axial, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton.

O chumbo, atendendo às incertezas, praticamente não foi considerado nos resultados adquiridos pelo Tornado. Esta incerteza pode ser justificada porque o chumbo é o elemento com menor concentração nas amostras.

Para os resultados obtidos pelo Tornado, figura 6.7, o chumbo parece não variar muito nem entre métodos, nem entre séculos. Os valores da sua concentração estão na ordem de grandeza dos 10 µg/g.

Para os resultados do Tri-axial, figura 6.8, a situação já é diferente. Pelo método dos parâmetros fundamentais o cenário é semelhante ao que se passava no Tornado, mas analisando as correções com o Compton e de C/R as concentrações do chumbo são da ordem de grandeza abaixo dos PF. O Compton tem a incerteza mais elevada.



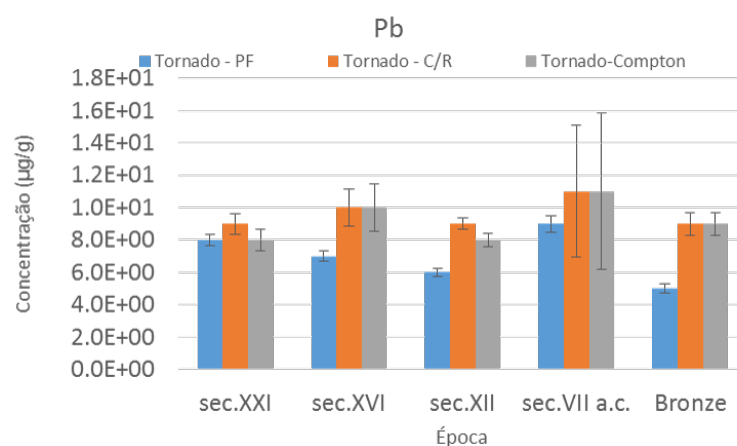


Figura 6.7: Gráfico das concentrações do Pb, obtidas no tornado, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton.

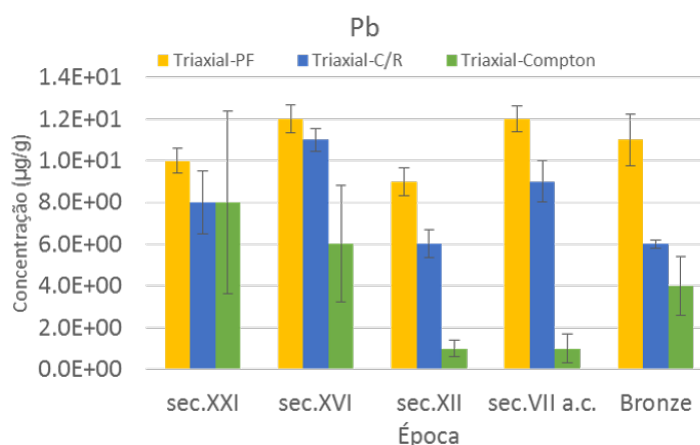


Figura 6.8: Gráfico das concentrações do Pb, obtidas no Tri-axial, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton.

O Sr é um elemento que apresenta poucas variações para os dois equipamentos e para todos os métodos à exceção do da correção de C/R (Figuras 6.9 e 6.10).

A concentração de Sr para a correção de C/R, no caso do Tornado, apresenta uma concentração média semelhante à dos outros métodos. Olhando para os resultados do Tri-axial, as concentrações, usando este método quantitativo, são cerca de 40-50% abaixo dos valores do Tornado.

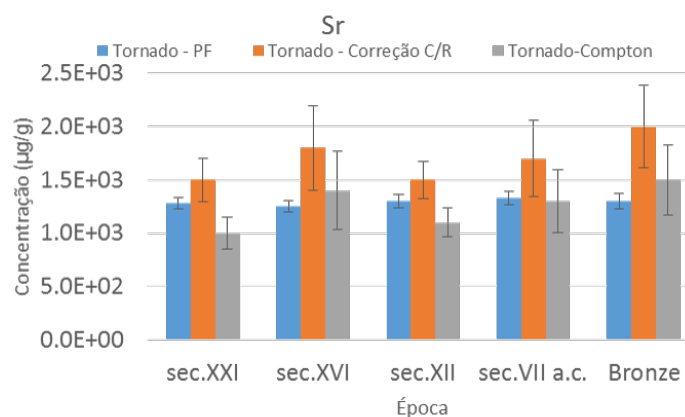


Figura 6.9: Gráfico das concentrações do Sr, obtidas no tornado, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton.

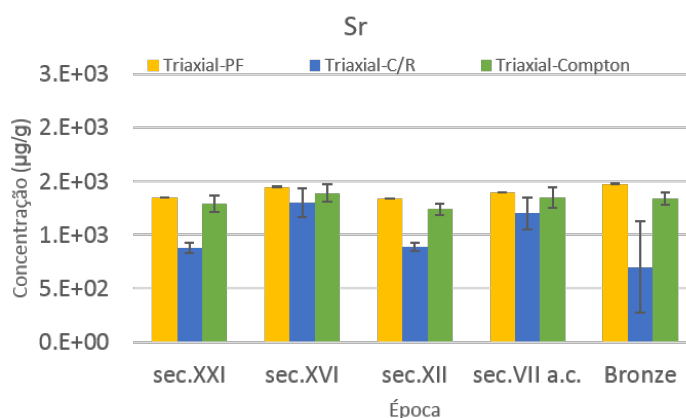


Figura 6.10: Gráfico das concentrações do Sr, obtidas no Tri-axial, recorrendo aos métodos quantitativos dos PF, correção com C/R e correção com o Compton.

Apesar de o método da correção com o Compton não ser o melhor para quantificar o chumbo das amostras dos métodos comparativos é o método mais adequado às nossas amostras.

Para os restantes elementos, a correção com o Compton é a mais consistente.

Na figura 6.11 estão representados todos os elementos ao longo do tempo, usando a correção com o Compton para a quantificação das amostras.

Comparando os resultados dos dois equipamentos, o Tornado, ao contrário do Tri-axial, consegue detetar elementos com baixas concentrações, como é o caso do chumbo.

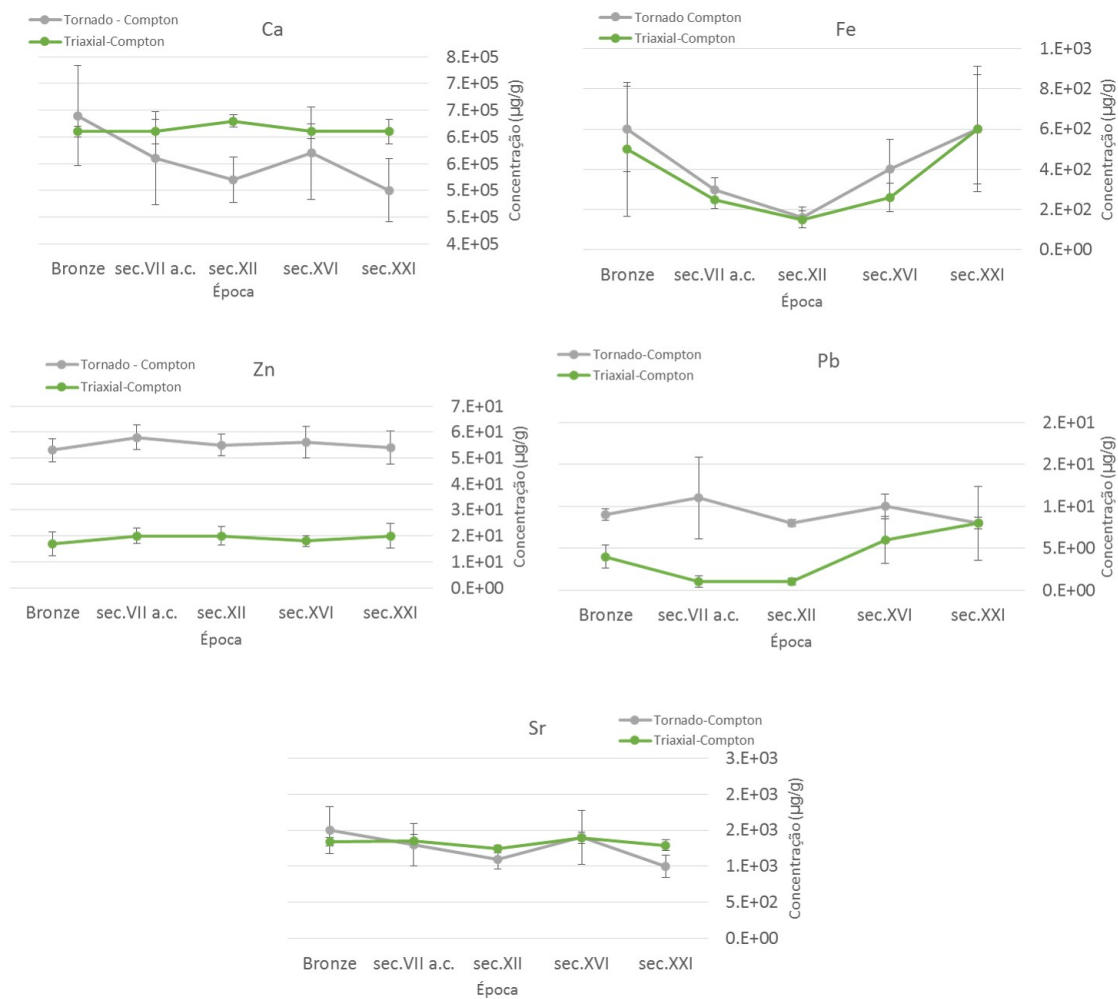


Figura 6.11: Evolução da concentração dos vários elementos desde a Idade do Bronze até à atualidade.



## CONCLUSÕES

Com a realização das análises dos exosqueletos de ameijoas, seria de esperar que existissem elementos tóxicos, tal como existem nas partes moles dos moluscos. No entanto, o único elemento pesado encontrado, em concentrações muito baixas, foi o chumbo.

Para além da presença do chumbo, as nossas amostras continham ferro, estrôncio, zinco e cálcio, este último pertencente à matriz de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) das conchas.

Depois da análise das concentrações recorrendo aos diferentes métodos quantitativos, conclui-se que o melhor método para quantificar as nossas amostras é o que aplica a correção com o pico de Compton. O método comparativo escolhido apresenta alguma dificuldade na quantificação do chumbo adquirido pelo sistema Tri-axial. Este facto poderia ser um problema se o chumbo não existisse numa concentração tão baixa e se não fosse constante ao longo dos séculos, como nos mostram os resultados do Tornado.

De todos os elementos o que revelou resultados mais interessantes foi o Fe por apresentar uma variação temporal significativa. No fim da idade do Bronze o ferro apresentava uma concentração de cerca de  $600 \mu\text{g/g}$ , a concentração desceu e atingiu o mínimo de cerca de  $200 \mu\text{g/g}$  no século XII. A concentração voltou a subir e na atualidade apresenta de novo o valor de cerca de  $600 \mu\text{g/g}$ .

Para os resultados serem mais conclusivos relativamente à evolução da concentração do Fe nas amostras, teriam de ser estudadas mais amostras, de épocas diferentes. Para as várias épocas dos bivalves deveria ser feito o levantamento do tipo de indústrias que ocuparam a zona do estuário do Tejo e os movimentos que estes tiveram a nível de embarcações e as especificações destas embarcações, tais como o combustível que utilizavam.

Por cada época estudada a amostragem deveria ser maior. Deste modo a incerteza associada às medidas poderia diminuir.

A coleção de conchas da idade do Bronze tinha poucos exemplares de exosqueletos de ameijoas, pelo que só foi possível usar três pastilhas cada uma composta por três conchas para a análise, ao contrário das restantes épocas em que foram usadas cinco pastilhas cada

uma composta por três conchas .

Relativamente aos padrões de osso que foram usados para a obtenção das regressões lineares, que posteriormente foram usadas para quantificar os elementos das amostras, deveriam ser mais. Deste modo, o coeficiente de determinação,  $R^2$ , teria valores mais próximo de 1 que significa que cada regressão linear se ajustaria melhor às amostras.

Para a validação do método, deveria ser adquirido um novo padrão de osso que tivesse na sua composição Fe visto que foi o elemento traço que mostrou maior interesse. Apesar do padrão caprine04 não ter validado o Fe, por não ser um dos constituintes, como os restantes picos, mais leves e mais pesados, apresentam um bom ajuste, podemos partir do princípio que os valores de concentração para o Fe são coerentes.

Por fim, comparando os dois equipamentos de fluorescência de raios-x dispersivos em energia, os resultados para as nossas amostras são melhores fazendo a aquisição com o Tornado.

## TRABALHOS FUTUROS

Para melhorar os resultados obtidos, seria interessante analisar conchas de outras épocas e de várias zonas do estuário do Tejo. Deste modo, seria possível fazer um mapeamento do estuário do Tejo, das concentrações dos elementos ao longo dos séculos.

Seria importante a elaboração de uma base de dados com os valores obtidos para vários tipos de padrões, por forma a replicar este processo para outro tipos de amostras.

Por vezes existem trabalhos que fazem a aquisição de uma grande quantidade de dados, na casa dos milhares. Para estes estudos deveriam ser aplicados métodos de *Machine Learning* para a classificação dos dados, por forma a facilitar a busca de padrões relativos ao comportamento das concentrações dos vários elementos.





## BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Hamester e D Becker. *OBTENÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO A PARTIR DE CONCHAS DE MARISCOS*.
- [2] J. Encarnação. *As cidades do poder na Hispânia Romana e a descoberta de uma cidade singular*. Centro de Arqueologia de Almada, 2014.
- [3] M. C.R.M. d. Oliveira. “Moluscos bivalves em Portugal: composição química e metais contaminantes”. Tese de doutoramento. Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2012.
- [4] V. d.A. C. Cunha. “Redução do teor de contaminantes químicos em bivalves provenientes do Estuário do Tejo”. Tese de doutoramento. ISA/UTL, 2012.
- [5] A. S. El-Sorogy e M. Youssef. “Assessment of heavy metal contamination in intertidal gastropod and bivalve shells from central Arabian Gulf coastline, Saudi Arabia”. Em: *Journal of African Earth Sciences* 111 (2015), pp. 41–53.
- [6] Wikipedia, the free encyclopedia. *Espectro EM pt*. [Online; accessed August 29, 2016]. URL: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectro\\_eletromagnetico#/media/File:Espectro\\_EM\\_pt.svg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectro_eletromagnetico#/media/File:Espectro_EM_pt.svg).
- [7] B. A. Microanalysis. *M4 Tornado - Physical Principles of Micro X-ray Fluorescence*. Bruker, 2001-2009.
- [8] A. Markowicz. “X-Ray Physics: Interaction with Matter, Production, Detection. R. Cesareo, Published by La Rivista del Nuovo Cimento della Societa Italiana di Fisica, Bologna, 2000, pp. 231.” Em: *XRS: X-ray Spectrometry* 31.6 (2002), p. 451. ISSN: 00498246.
- [9] Wikiwand. *Auger Electron Spectroscopy*. [Online; accessed August 29, 2016]. URL: [http://www.wikiwand.com/en/Auger\\_electron\\_spectroscopy](http://www.wikiwand.com/en/Auger_electron_spectroscopy).
- [10] B. Beckhoff, B. Kanngießer, N. Langhoff, R. Wedell e H. Wolff. *Handbook of practical X-ray fluorescence analysis*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [11] SlidePlayer. *Quantization of Charge, Light and Energy*. [Online; accessed August 29, 2016]. URL: [Adaptedfrom:http://slideplayer.com/slide/4279506/](http://slideplayer.com/slide/4279506/).
- [12] Silvério Ferreira da Silva Junior Paulo Villani Marques. *Apostila de END*. [Online; accessed August 29, 2016]. URL: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAaAQAC/apostila-end?part=3>.

- [13] A. A. M. René E. Van Grieken. *Handbook of X-Ray Spectrometry*. second. 270 Madison Avenue, New York, NY 10016: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN: 0-8247-0600-5.
- [14] R. Klockenkamper. *Total-reflection x-ray fluorescence analysis*. New York: Wiley, 1996.
- [15] R. Cesareo. *La Rivista del Nuovo Cimento: X-ray physics: Interaction with matter, production, detection*. Bologna: Società Italiana di Fisica, 2000.
- [16] M Guerra, M Manso, S Longelin, S Pessanha e M. L. Carvalho. "Performance of three different Si X-ray detectors for portable XRF spectrometers in cultural heritage applications". Em: *Journal of Instrumentation* 7.10 (2012), p. C10004. URL: <http://stacks.iop.org/1748-0221/7/i=10/a=C10004>.
- [17] A. Dias, M Carvalho, M. Carvalho e S Pessanha. "Quantitative evaluation of ante-mortem lead in human remains of the 18 th century by triaxial geometry and bench top micro X-ray fluorescence spectrometry". Em: *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30.12 (2015), pp. 2488–2495.
- [18] L. Luo, D. R. Chettle, H. Nie, F. E. McNeill e M. Popovic. "The effect of filters and collimators on Compton scatter and Pb K-series peaks in XRF bone lead analysis." Em: *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, B* 263. Industrial Radiation and Radioisotope Measurement Applications (2007), pp. 258 –261. ISSN: 0168-583X.
- [19] E. Marguá, I. Queralt, M. Carvalho e M. Hidalgo. "Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area." Em: *Analytica Chimica Acta* 549 (2005), pp. 197 –204. ISSN: 0003-2670.
- [20] O. Gonzalez-Fernandez, I. Queralt, M. Carvalho e G. Garcia. "Elemental analysis of mining wastes by energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF)." Em: *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, B* 262 (2007), pp. 81 –86. ISSN: 0168-583X.
- [21] R. Rousseau. "Concept of the influence coefficient". Em: *Rigaku J* 18.1 (2001), pp. 8–14.
- [22] R. Tertian e F. Claisse. *Principles of quantitative X-ray fluorescence analysis*. Heyden, 1982. ISBN: 9780855017095. URL: <https://books.google.pt/books?id=5OrvAAAAMAAJ>.
- [23] B. Z. Shatendra K. Sharma Rafal Sitko. *X-Ray Spectroscopy*. second. INTECH, 2012. ISBN: 978-953-307-967-7. DOI: [10.5772/29367](https://doi.org/10.5772/29367).
- [24] A. V. CARNEIRO e V. Nascimento Filho. "Análise quantitativa de amostras geológicas utilizando a técnica de fluorescência de raios X por dispersão de energia". Em: *Scientia Agricola* 53.1 (1996), pp. 94–104.

- [25] M. O. Pereira, C. de Carvalho Conti, M. J. dos Anjos e R. T. Lopes. "Correction of radiation absorption on biological samples using Rayleigh to Compton scattering ratio". Em: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 280 (2012), pp. 39–44. ISSN: 0168-583X. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nimb.2012.02.032>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X12001462>.
- [26] O. Gonzalez-Fernandez, S. Pessanha, I. Queralt e M. L. Carvalho. "Analysis of lead content in automotive shredder residue (ASR)". Em: *Waste Management* 29.9 (2009), pp. 2549–2552. ISSN: 0956-053X. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2009.05.003>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X09001779>.
- [27] D. DiScenza, A. Keimowitz e N Fitzgerald. "Calibration and Evaluation of an X-Ray Fluorescence Method for the Determination of Lead and Arsenic in Soils". Em: *J Environ Anal Chem* 1.103 (2014), p. 2.
- [28] V. Trunova, A. Sidorina e K. Zolotarev. "Using external standard method with absorption correction in SRXRF analysis of biological tissues". Em: *X-Ray Spectrometry* 44.4 (2015), pp. 226–229.
- [29] C Horrich, S Smolek, A Maderitsch, R Simon, P Kregsamer e C Strelj. "Investigation of element distribution and homogeneity of TXRF samples using SR-micro-XRF to validate the use of an internal standard and improve external standard quantification". Em: *Analytical and bioanalytical chemistry* 400.8 (2011), pp. 2649–2654.
- [30] T. T. Chiweshe, W. Purcell e J. A. Venter. "Evaluation of different internal standards for precious metals quantification". Em: *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* 30.1 (2016), pp. 55–70.
- [31] Z. Mzyk, J. Anyszkiewicz e T. Gorewoda. "Special tablets containing cellulose binder and Sr internal standard for simplifying X-ray fluorescence analysis of powder samples". Em: *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 114 (2015), pp. 15–19.
- [32] J. Stankey, C Akbulut, J. Romero e S Govindasamy-Lucey. "Evaluation of X-ray fluorescence spectroscopy as a method for the rapid and direct determination of sodium in cheese". Em: *Journal of dairy science* 98.8 (2015), pp. 5040–5051.
- [33] J. C. Chan e P. T. Palmer. "Determination of calcium in powdered milk via X-ray fluorescence using external standard and standard addition based methods". Em: *Journal of Chemical Education* 90.9 (2013), pp. 1218–1221.
- [34] Z. Uzunoğlu, D. Yılmaz e Y. Şahin. "Quantitative x-ray spectrometric analysis with peak to Compton ratios". English. Em: *Radiation Physics and Chemistry* 112. Complete (2015), pp. 189–194. DOI: [10.1016/j.radphyschem.2015.03.039](http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.03.039).
- [35] R. Nesbitt, H Mastins, G. Stolz e D. Bruce. "Matrix corrections in trace-element analysis by X-ray fluorescence: An extension of the Compton scattering technique to long wavelengths". Em: *Chemical Geology* 18.3 (1976), pp. 203–213.



## ANEXOS



## Anexo 1- Certificado Padrões Bovine e Caprine

### CERTIFIED REFERENCE VALUES AND UNCERTAINTIES:

The certified reference values for lead (Table 1) were the mean of the results obtained by the definitive method of double (reverse spike) isotope dilution inductively coupled mass spectrometry.

Table 1. Certified Reference Values for Lead

	Lead concentration <sup>a</sup> (µg g <sup>-1</sup> )
NYS RM 05-01 Lead in Bovine Bone	1.09 ± 0.03
NYS RM 05-02 Lead in Bovine Bone	16.1 ± 0.3
NYS RM 05-03 Lead in Caprine Bone	13.2 ± 0.3
NYS RM 05-04 Lead in Caprine Bone	31.5 ± 0.7

<sup>a</sup>The uncertainty in the certified value is calculated as  $U = kuc$ , where  $uc$  is the combined standard uncertainty calculated according to the ISO Guide [4] and  $k$  is the coverage factor. The value of  $uc$  is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of uncertainty components associated with the measurement uncertainty, additional Type B uncertainties, and for Level 1, material heterogeneity. The coverage factor,  $k$ , is equal to 2. The expanded uncertainty,  $U = kuc$ , is defined as an interval estimated to have a level of confidence of 95 %.

### INFORMATION VALUES:

Information values for lead isotope ratios (Table 2) were determined via an interlaboratory study. Values are mean of these methods. Methods included ICP-MS, HR-ICP-MS and MC-ICP-MS.

Table 2. Information Values for Lead Isotopes

	<sup>204</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	<sup>207</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	<sup>208</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb
NYS RM 05-01 Lead in Bovine Bone	0.0535	0.8330	2.042
NYS RM 05-02 Lead in Bovine Bone	0.0527	0.8320	2.033
NYS RM 05-03 Lead in Caprine Bone	0.0548	0.8544	2.070
NYS RM 05-04 Lead in Caprine Bone	0.0552	0.8622	2.079

## Anexo 2- Certificado Padrões Bovine e Caprine

Information values for additional elements (Table 3) were established via an interlaboratory study. Methods included ICP-OES, ICP-MS, and HR-ICP-MS.

Table 3. Information Values for Additional Elements

	( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) NYS RM 05-01 Lead in Caprine Bone	NYS RM 05-02 Lead in Caprine Bone	NYS RM 05-03 Lead in Caprine Bone	NYS RM 05-04 Lead in Caprine Bone
Al	290	360	170	170
Ba	100	100	97	120
Ca	267,000	260,000	261,000	264,000
Fe		3.2		2.9
K	220			210
Li		0.89	0.49	0.50
Mg	4,400	4,200	4,200	4,300
Mn	2.1	2.2	1.3	1.6
Mo	0.64			
Na	6,900	6,800	6,800	6,900
P	124,000	120,000	122,000	125,000
Sr	170	160	150	150
Zn	85	80	79	81

### REFERENCES

- [1] Bellis DJ, Hetter KM, Verostek MF, and Parsons PJ. Characterization of candidate reference materials for bone lead via interlaboratory study and double isotope dilution mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2008, 23, 298-308.
- [2] Parsons, PJ, Reilly, AA, Esernic-Jenssen, D, Werk, LN, Mofenson, HC, Stanton, NV, Matte, TD, Evaluation of blood lead proficiency testing: Comparison of open and blind paradigms. *Clinical Chemistry* 2001, 47, 322-330.
- [3] Hetter KM, Bellis DJ, Geraghty C, Todd AC and Parsons PJ. Development of candidate reference materials for the measurement of lead in bone. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, 391, 2011-2021.
- [4] Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISBN 92-67-10188-9, 1st Ed. ISO, Geneva, Switzerland (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.



## Anexo 3 - Certificado bone ash

---

Material Source: The material for this SRM was produced by the Monsanto Co., St Louis, MO.

Homogeneity Assessment: Samples from randomly selected bottles of SRM 1400 were tested for homogeneity using x-ray fluorescence spectrometry. No evidence of material heterogeneity was observed in any of the elements measured which included strontium, zinc, copper, iron, phosphorus, calcium, and potassium.

Certified Concentrations and Uncertainties: The certified value is the mean of method results from a definitive analytical method or the weighted mean of results from at least two independent analytical methods or laboratories. The uncertainty is the half-width of a 95% confidence interval for the mean with an allowance for systematic differences between methods.

Table 1. Certified Concentrations of Constituent Elements

<u>Element</u>	<u>Concentration,</u> <u>wt. percent</u>		<u>Element</u>	<u>Concentration</u> <u>µg/g</u>
Calcium	38.18	± 0.13	Iron	660 ± 27
Magnesium	0.684	± 0.013	Lead	9.07 ± 0.12
Phosphorus	17.91	± 0.19	Potassium	186 ± 8
			Strontium	249 ± 7
			Zinc	181 ± 3

Non-certified Concentrations: Elements other than those certified are present in this material. Those that were determined but are not certified are provided as additional information on the composition.

Table 2. Non-certified Concentrations of Constituent Elements

<u>Element</u>	<u>Concentration,</u> <u>wt. percent</u>	<u>Element</u>	<u>Concentration</u> <u>µg/g</u>
Silicon	(0.13)	Aluminum	(530)
Sodium	(0.6)	Arsenic	(0.4)
Moisture		Cadmium	(0.03)
2 h @ 105 °C	(0.2)	Copper	(2.3)
-----		Fluorine	(1250)
Loss on ignition		Manganese	(17)
@ 1000 °C	(0.87)	Selenium	(0.08)



## Anexo 4 – Certificado bone meal

Table 1. Certified Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for SRM 1486

Constituent Element	Mass Fraction (%)			Constituent Element	Mass Fraction (mg/kg)		
Calcium (Ca) <sup>a,b,c</sup>	26.58	±	0.24	Iron (Fe) <sup>d,e</sup>	99	±	8
Magnesium (Mg) <sup>b,f</sup>	0.466	±	0.017	Lead (Pb) <sup>e</sup>	1.335	±	0.014
Phosphorus (P) <sup>a,d</sup>	12.30	±	0.19	Potassium (K) <sup>e,g</sup>	412	±	4
				Strontium (Sr) <sup>e,g</sup>	264	±	7
				Zinc (Zn) <sup>d,e</sup>	147	±	16

<sup>(a)</sup> Gravimetry

<sup>(b)</sup> Instrumental neutron activation analysis (INAA)

<sup>(c)</sup> Titrimetry

<sup>(d)</sup> Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)

<sup>(e)</sup> Isotope dilution thermal ionization mass spectrometry (ID TIMS)

<sup>(f)</sup> Isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID ICPMS)

<sup>(g)</sup> Flame atomic emission spectrometry (FAES)

Table 2. Reference Mass Fraction Value (Dry-Mass Basis) for SRM 1486

Constituent Element	Mass Fraction (mg/kg)		
Mercury (Hg) <sup>a</sup>	0.0023	±	0.0014

<sup>(a)</sup> Isotope dilution cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry (ID CVICPMS) [2,3]

Table 3. Information Values (Dry-Mass Basis) for SRM 1486

Constituent Element	Mass Fraction (%)	Constituent Element	Mass Fraction (mg/kg)
Carbon, Total (C)	18.6	Aluminum (Al)	<1
Silicon (Si)	<0.02	Arsenic (As)	0.006
Sodium (Na)	0.5	Cadmium (Cd)	0.003
		Copper (Cu)	0.8
Loss on Ignition at 1000 °C	31.5	Fluorine (F)	800
		Manganese (Mn)	1
		Selenium (Se)	0.13

Table of X-ray Emission Energies (keV)



atomic number	$K_{\alpha}$	$K_{\beta}$	$L_{\alpha}$	$L_{\beta_1}$	$L_{\beta_2}$	$L_{\gamma_1}$
1 H						
2 He						
3 Li						
4 Be						
5 B						
6 C	0.277					
7 N	0.392					
8 O	0.525					
9 F	0.677					
10 Ne	0.848					
11 Na	1.041	1.067				
12 Mg	1.253	1.295				
13 Al	1.486	1.553				
14 Si	1.739	1.829				
15 P	2.013	2.138				
16 S	2.307	2.464				
17 Cl	2.621	2.815				
18 Ar	2.952	3.190				
19 K	3.312	3.589				
20 Ca	3.690	4.012	0.341	0.345		0.350
21 Sc	4.088	4.460	0.395	0.400		0.407
22 Ti	4.508	4.931	0.452	0.458		0.460
23 V	4.949	5.426	0.511	0.519		0.520
24 Cr	5.411	5.924	0.573	0.583		0.583
25 Mn	5.894	6.489	0.637	0.649		0.652
26 Fe	6.398	7.057	0.705	0.718		0.721
27 Co	6.924	7.648	0.776	0.791		0.794
28 Ni	7.471	8.263	0.851	0.869		
29 Cu	8.040	8.904	0.930	0.950		
30 Zn	8.630	9.570	1.012	1.034		
31 Ga	9.241	10.262	1.098	1.125		
32 Ge	9.874	10.979	1.188	1.218		
33 As	10.530	11.722	1.282	1.317		
34 Se	11.207	12.492	1.379	1.419		
35 Br	11.907	13.287	1.480	1.526		
36 Kr	12.631	14.107	1.586	1.636		
37 Rb	13.373	14.956	1.694	1.752		
38 Sr	14.140	15.829	1.806	1.871		
39 Y	14.931	16.731	1.922	1.955		
40 Zr	15.744	17.660	2.042	2.124	2.219	1.703
41 Nb	16.581	18.614	2.166	2.257	2.367	2.050
42 Mo	17.441	19.600	2.293	2.394	2.518	2.461
43 Tc	18.325	20.608	2.424	2.536		2.623
44 Ru	19.233	21.646	2.558	2.683	2.835	2.964
45 Rh	20.165	22.712	2.698	2.834	3.001	3.143
46 Pd	21.121	23.806	2.838	2.990	3.171	3.328
47 Ag	22.101	24.928	2.984	3.150	3.347	3.519
48 Cd	23.106	26.081	3.133	3.316	3.528	3.716
49 In	24.136	27.260	3.286	3.487	3.713	3.920

## Anexo 6 – Limites de Detecção

Table 1. Accuracy and detection limits in  $\mu\text{g g}^{-1}$  obtained for the the microanalytical system in bone samples (N= 4)

	NYS RM 05-02 Bovine Bone					NIST SRM 1400 Bone ash					NYS RM 05-04 Caprine Bone		
	Obtained triaxial setup	Obtained Tornado	Certified	Detection limits triaxial setup	Detection limits Tornado	Obtained triaxial setup	Obtained Tornado	Certified	Detection limits triaxial setup	Detection limits	Obtained triaxial setup	Obtained Tornado	Certified
Ca	27%±5%	30%±7%	26%	90	150	37%±1%	30%±7%	38.28%±0.13	100	150	27%±5%	29%±7%	26.4%
Zn	75±5	90±20	80	2	30	180±10	160±30	181±3	4	20	80±2	70±10	81
Sr	150±10	170±10	160	2	7	210±20	240±10	249±7	3	7	155±5	150±9	150
Pb	17±2	15±9	16.1±0.3	2	3	11±3	7±3	9.1±0.1	3	3	33±3	30±20	31.5±0.7

Table 2. Accuracy and detection limits in  $\mu\text{g g}^{-1}$  obtained for the microanalytical system in SRM IAEA-soil 7 samples (N= 4)

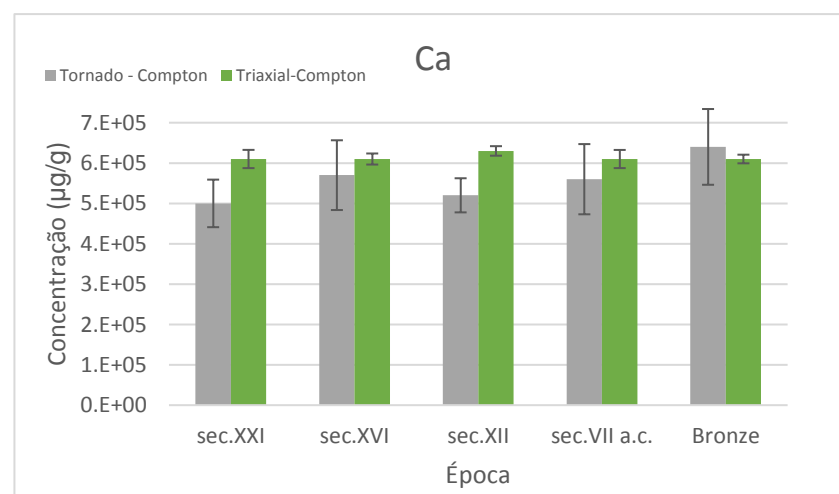
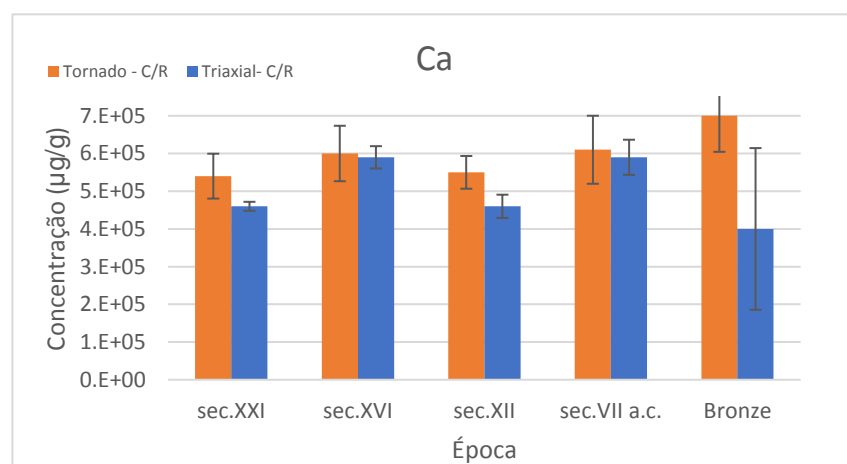
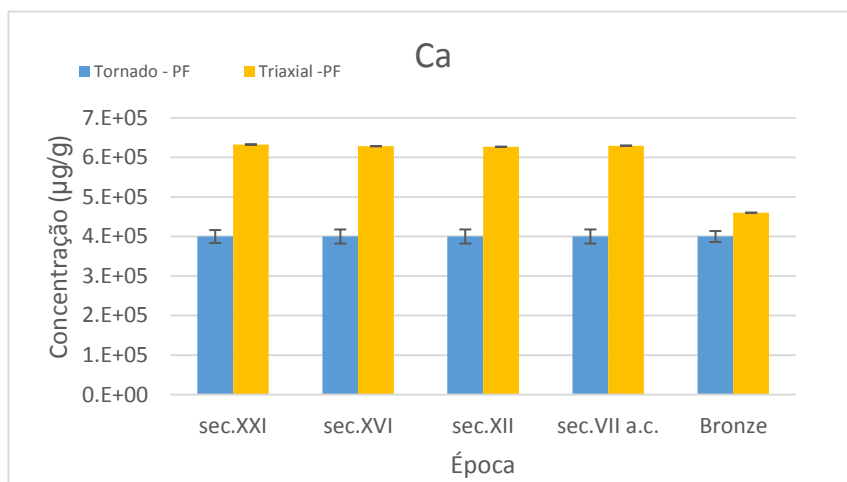
Element	Ca	Zn	Sr	Pb
Certified value	16.3%±6.0%	104±3	108±5	60±5
Present work	16%±6%	110±40	130±50	50±20
Detection limits	180	50	8	5



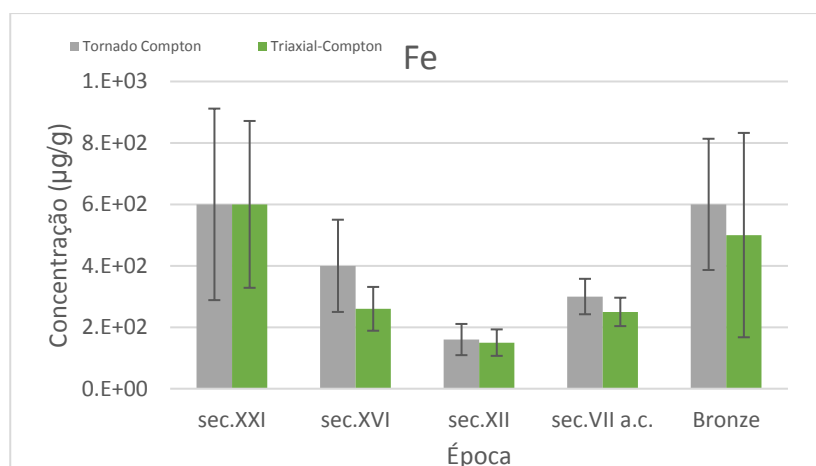
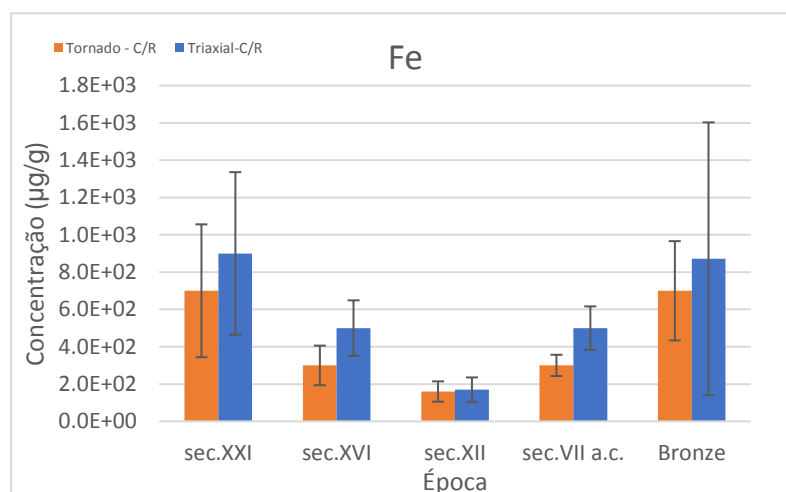
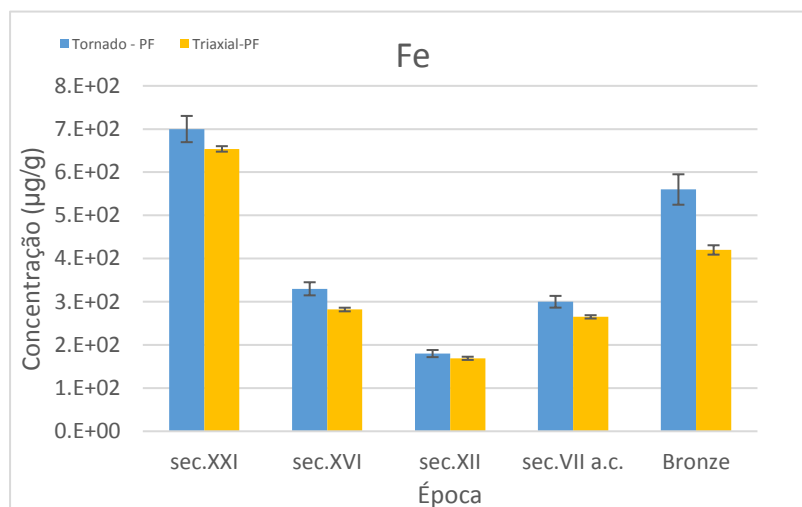
## APÊNDICES



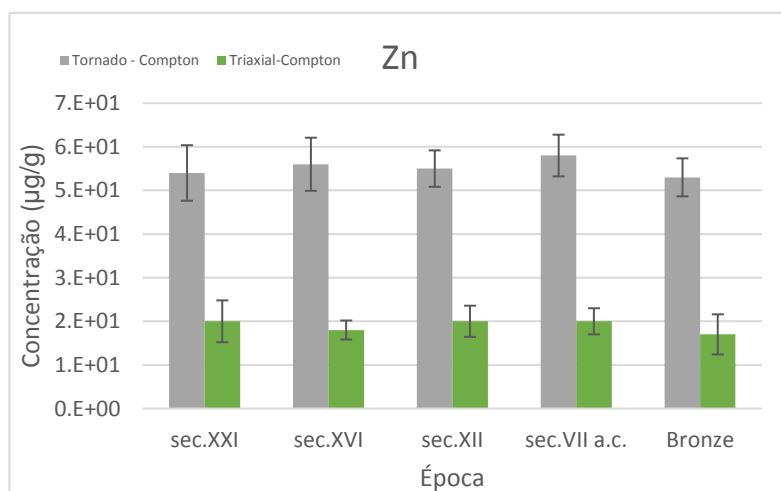
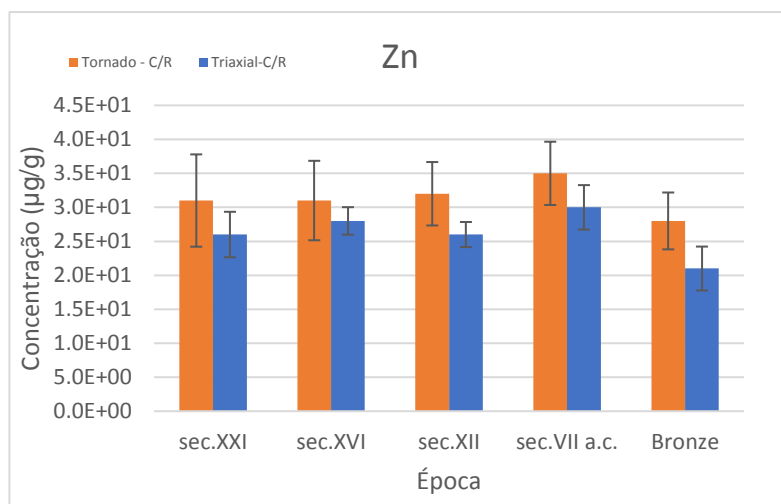
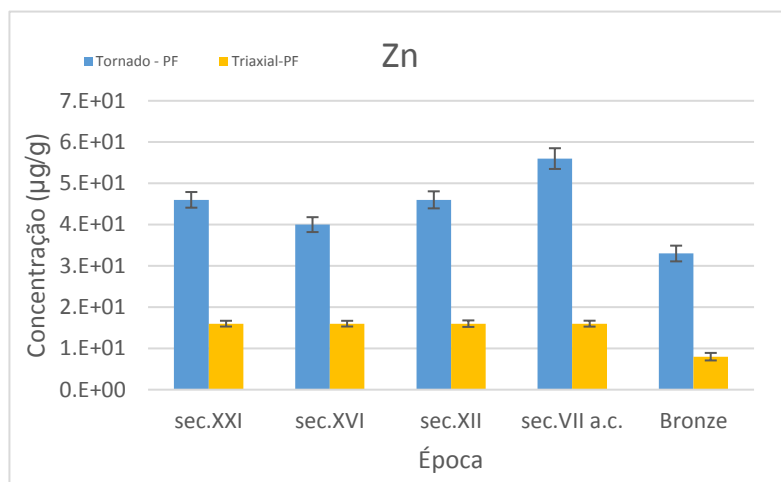
## Apêndice 1- Gráficos com concentrações do Ca



## Apêndice 2- Gráficos com concentrações do Fe

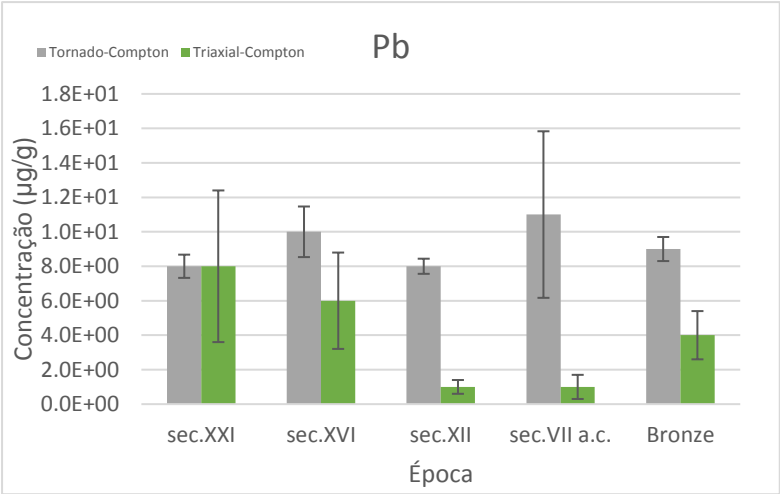
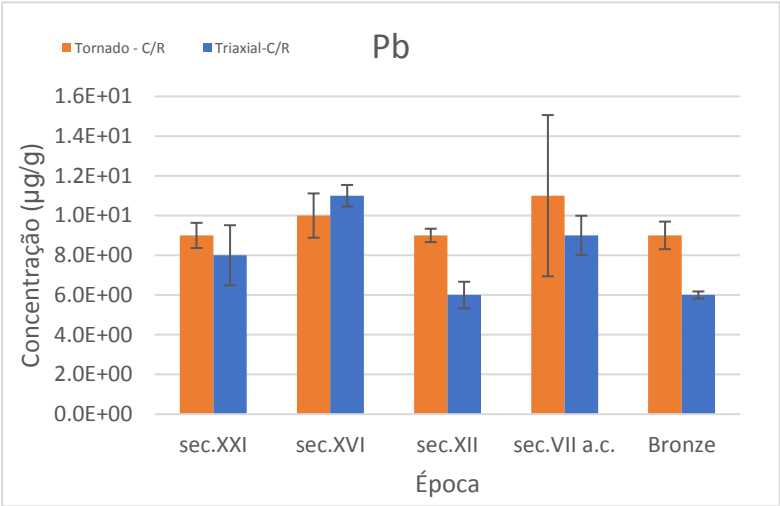
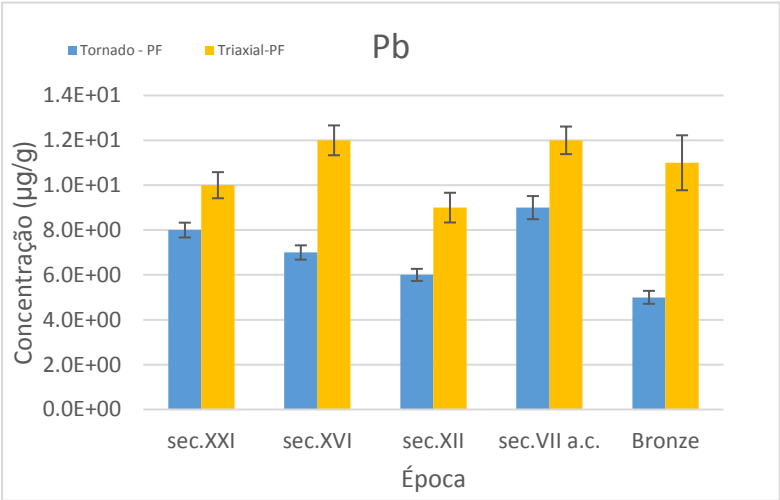


### Apêndice 3- Gráficos com concentrações do Zn

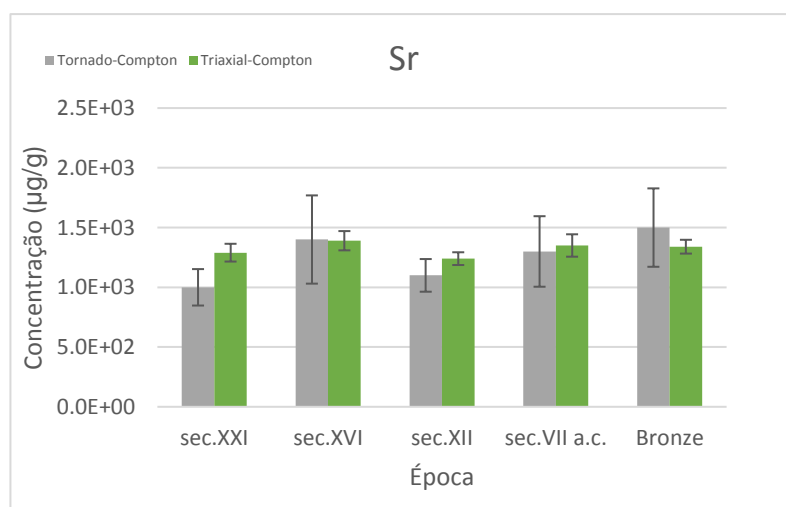
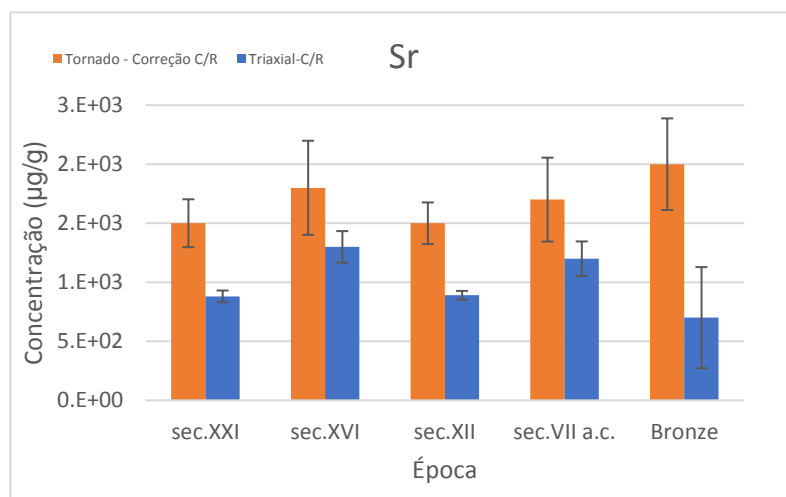
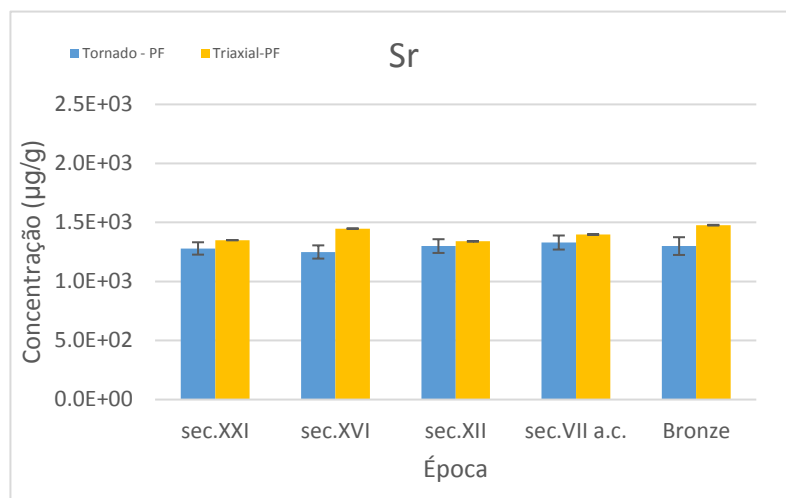




Apêndice 4- Gráficos com concentrações do Pb



## Apêndice 5- Gráficos com concentrações do Sr



# Application of XRF technic for characterization of toxic elements in some species of bivalves shells of the XVth century

C. P. S. Fonseca<sup>1</sup>, S. Pessanha<sup>1</sup>, M. L. Carvalho<sup>1</sup> and A. A. Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LIBPhys-UNL Laboratório de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Física da Radiação Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

## Introduction

The mollusks natural habitat are lagoons, estuaries and coastal water. The gathering of nutrients is done by filtering large volumes of water that contain particles in suspension and/or detritus of organic matter in decomposition over the sediments.

As these waters are frequently polluted by toxic contaminants as mercury (Hg), cadmium (Cd) and lead (Pb) these bivalve mollusks eventually incorporate the heavy metals in their organism, what may pose as a concern to public health, because incorporate the food chain until reaching the human beings [1].

The purpose of this work is to evaluate the presence of toxic elements on the exoskeleton of mollusks belonging to the XV century, which were a courtesy from the Museu de Arqueologia e História de Almada.

## Experimental procedure

### Sample preparation

Prior to analysis the samples were washed in water. They were ground in a mortar and pressed into pellets with 2 cm of diameter.

In Fig. 1 are shown the species that were analyzed.



Fig. 1 – Species:  
1- *Crassostrea Gigas* (oyster);  
2- *Donax* (donax);  
3- *Mytilus edulis* (blue mussel);  
4- *Cerastoderma edule* (common edible cockle);  
5- *Spisula solidus* (solid surf clam);  
6- *Concholepas concholepas* (false abalone).

### Samples analysis

To determine the elemental composition of the samples an Energy Dispersive X-ray Fluorescence (EDXRF) setup with tri-axial geometry was used, as shown in Fig. 2. Quantification was performed making use of the Fundamental Parameters method. This technique is non-destructive.



Fig. 2 – EDXRF spectrometer with tri-axial geometry

## Results

The matrix of exoskeletons is composed of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ). In Figs. 3 we compare the concentrations of the trace elements present in the different species, namely, Fe, Cu, Zn, As, Br, Sr and Pb. Neither Cd or Hg were detected with our system.

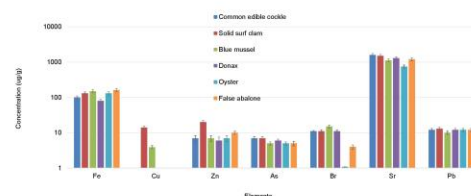


Fig. 3 – Elemental Concentrations of same element in different species

In Fig. 4, two spectra are overlapped to show the difference between the existence of Bromine in each sample (solid surf clam and oyster). The concentration of Bromine in oyster sample is below detection limit.

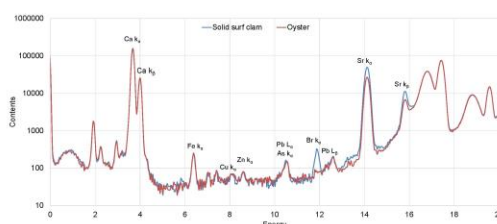


Fig. 4 – Spectra of solid surf clam and oyster

## Conclusions

With the EDXRF analysis we can see very low concentration of Bromine in oyster, when compared to the other samples. Otherwise solid surf clam compared to the other samples has a higher concentration of copper and zinc.

The concentrations of iron, arsenic and lead are very similar in all samples. Strontium present the higher concentration compared to other elements.

## Acknowledgements

The authors acknowledge Museu de Arqueologia de Almada, mainly to Dr. Fernando Henriques and Dr. Luis Barros for supporting the investigation.

[1] Oliveira, Maria Cidália - Moluscos Bivalves em Portugal: Composição Química e Metais Contaminantes. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2012

## Apêndice 7- Poster apresentado na conferência EDXRS2016

# Application of XRF to determine the concentration of toxic elements in bivalves from *Estuário do Tejo* belonging to 11<sup>th</sup> century to 21<sup>st</sup> century

C. P. S. Fonseca<sup>1</sup>, S. Pessanha<sup>1</sup>, M. L. Carvalho<sup>1</sup> and A. A. Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LIBPhys-UNL Laboratório de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Física da Radiação Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

## Introduction

The mollusks natural habitat are lagoons, estuaries and coastal water. The gathering of nutrients is done by filtering large volumes of water that contain particles in suspension and/or detritus of organic matter in decomposition over the sediments.

As these waters are frequently polluted by toxic contaminants as lead (Pb) these bivalve mollusks eventually incorporate the heavy metals in their organism, what may pose as a concern to public health, because incorporate the food chain until reaching the human beings [1].

The purpose of this work is to evaluate the presence of toxic elements on the exoskeleton of clams belonging to the 11<sup>th</sup> century, 15<sup>th</sup> century, provided by the Museum of Archaeology and History of the city of Almada (Portugal), and to the 21<sup>st</sup> century clams from *Estuário do Tejo*.

## EDXRF setups

To determine the elemental composition of the samples an Energy Dispersive X-ray Fluorescence (EDXRF) setup from Bruker, the M4 Tornado with a conventional geometry (Fig.1, a) and another setup with tri-axial geometry were used (Fig.1, b). This technique is non-destructive.



Fig.1. – a) Bruker M4 Tornado ; b) Setup tri-axial

## Results

Spectra deconvolution and fitting was performed using Origin 2015 and quantification was carried out using a comparative method based of Standard Reference Materials, on samples analyzed with M4 Tornado and the tri-axial setup, and using the fundamental parameters with the software of M4 Tornado.

To apply the comparative mode the standard samples which were used were, NYS RM 05-02 (bovine bone), NYS RM 05-03 (caprine bone), NIST 1486 (bone meal) and NIST 1400 (bone ash). To verify this method another standard sample was used: NYS RM 05-04, as it is shown in Tables 1 and 2.

Table 1 – Comparison of the concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) obtained and certified for NYS 05-04 reference material

Tornado							
Ca		Zn		Pb		Sr	
Obtained	Certified	Obtained	Certified	Obtained	Certified	Obtained	Certified
260000 $\pm 20000$	264000	77 $\pm$ 8	81	14 $\pm$ 2	31.5 $\pm$ 0.7	160 $\pm$ 20	150
Tri-axial							
Ca		Zn		Pb		Sr	
Obtained	Certified	Obtained	Certified	Obtained	Certified	Obtained	Certified
260000 $\pm 20000$	264000	87 $\pm$ 9	81	33 $\pm$ 4	31.5 $\pm$ 0.7	150 $\pm$ 20	150

The matrix of exoskeletons is composed of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ).

To quantify the spectra data using the fundamental parameters with the software of M4 Tornado it was considered the matrix of  $\text{CaCO}_3$ .



Fig.2 – Elemental concentrations obtained with comparative mode and with fundamental parameters methods in samples belonging to a) sec.XXI, b) sec.XV and c) sec.XI

To have a better visualization on the concentrations of the samples from different centuries spectra were overlapped, as it is shown in Fig.3 a), b)

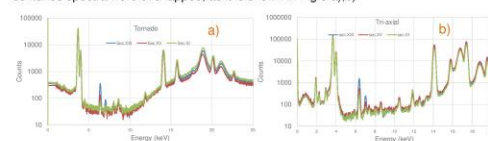


Fig.3 – Spectra overlapping a) M4 Tornado, b) Tri-axial

## Conclusions

Comparing the different methods it is possible to notice that the concentration of almost all elements are similar, except the concentration of calcium.

As standard samples do not have copper and bromine, it is not possible to apply the comparative mode, so to achieve the concentration of these elements it was used the fundamental parameters method.

Across the centuries only iron has an increase of concentration. All the other elements belong with similar concentration.

## Acknowledgements

The authors acknowledge Museu de Arqueologia de Almada, mainly to Dr. Fernando Henriques and Dr. Luís Barros for supporting the investigation.

[1] Oliveira, Maria Cidália - Moluscos Bivalves em Portugal: Composição Química e Metais Contaminantes. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2012





# Aplicação de fluorescência de raios-X para a determinação de elementos tóxicos em bivalves de diferentes períodos históricos

C. P. S. Fonseca<sup>1</sup>, S. Pessanha<sup>1</sup>, M. L. Carvalho<sup>1</sup> e A. A. Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LIBPhys-UNL Laboratório de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Física da Radiação Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

## Introdução

O habitat natural dos moluscos são lagoas, estuários e águas costeiras. A obtenção de nutrientes é feita pela filtragem de um volume considerável de água que contém partículas em suspensão e/ou matéria orgânica em decomposição depositada em sedimentos. Como estas águas são frequentemente poluídas por contaminantes tóxicos como o chumbo (Pb), os bivalves, por serem bons bioindicadores, podem incorporar os contaminantes presentes nas águas, tornando-se um perigo para a saúde pública. [1] Este trabalho teve o propósito de avaliar a presença de elementos tóxicos em exossqueletos de ameijoas, datados desde o final da Idade do Bronze (sec. XIV a sec. VIII a.c.) até à atualidade, por forma a avaliar a evolução da poluição do estuário do Tejo. As amostras foram cedidas pelo Museu de Arqueologia e História da cidade de Almada e foram analisadas por Espectrometria de Fluorescência de raios-X. Os espectros obtidos foram tratados utilizando o software OriginPro® 2015 e as concentrações elementares foram obtidas pelo método dos parâmetros fundamentais e pelo modo comparativo.

## Montagens EDXRF

Para determinar os elementos presentes nas amostras, foi utilizada a técnica de espectrometria de fluorescência de raios-X dispersiva em energia. Recorrendo a dois equipamentos diferentes, um com geometria tri-axial (Fig.1 b)) e outro com geometria convencional, M4 Tornado da Bruker (Fig.1 a)).

Por ser uma técnica não destrutiva, as amostras podem ser armazenadas e estudadas de novo.



Fig. 1. - a) Bruker M4 Tornado; b) Geometria tri-axial

## Resultados

A desconvolução dos espectros e o ajuste foram feitos utilizando o software OriginPro 2015. A quantificação foi feita recorrendo ao método comparativo, baseado em amostras padrão e ao método dos parâmetros fundamentais, que considera aspetos como as condições de medição e a configuração experimental.

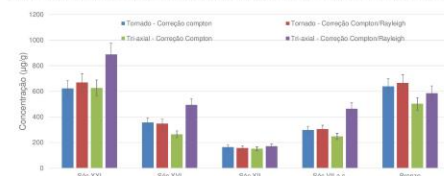
Para aplicar o modo comparativo usaram-se os seguintes padrões de osso: NYS RM 05-02 (bone bovine), NYS RM 05-03 (bone caprine), NIST 1486 (bone meal) e NIST 1400 (bone ash). Para validar os métodos quantitativos utilizou-se o padrão NYS RM 05-04 (bone caprine). Na tabela 1 é feita a comparação dos valores certificados com os valores experimentais.

Tabela 1 - Comparação da concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) obtida e certificada para a amostra padrão NYS 05-04. Recorrendo ao método dos parâmetros fundamentais e ao modo comparativo.

Elementos	Certificado	Caprine 04			
		Tornado		Tri-axial	
		PF	Área/Comp	PF	Área/Comp
Ca	26400	260000.20000	257000.26000	260000.20000	260000.26000
Zn	81	7748	8649	8719	8849
Pb	31.540.7	1462	1462	3364	3544
Sr	150	160420	160420	150420	160420

Para quantificar os espectros pelos parâmetros fundamentais, considerou-se a matriz de  $\text{CaCO}_3$ , por ser esta a composição dos exossqueletos. Na utilização do modo comparativo, procedeu-se à correção das intensidades características, baseados nos picos de dispersão (Compton e na razão Compton-Rayleigh).

No gráfico abaixo, está representada a evolução da concentração do Ferro em ( $\mu\text{g/g}$ ), desde o fim da idade do bronze (sec. XIV - VIII a.c.) até à atualidade. O estudo foi feito recorrendo às duas montagens e utilizando a correção de Compton e a correção de Compton-Rayleigh.



Gráf. 1 - Concentração de Ferro ao longo de vários séculos, utilizando diversos métodos.

Para além do ferro foi detetado: zinco, estrôncio, chumbo e cálcio. Este último era esperado por fazer parte da matriz da amostra.

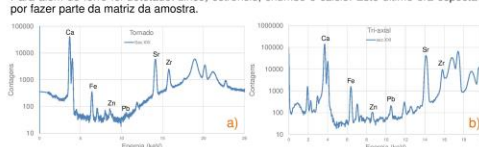


Fig. 2 - Espectros a) M4 Tornado, b) Tri-axial

## Conclusões

Comparando os resultados obtidos com as diferentes correções, conclui-se que não se verifica uma grande diferença nas concentrações.

Nas várias amostras estudadas observou-se que o ferro é o elemento que apresenta maior variação de concentração ao longo do tempo. Sendo que a sua maior concentração se verifica nos dias de hoje. Todos os outros elementos mantiveram uma concentração semelhante com o passar dos séculos.

Os padrões não apresentavam cobre nem bromo, pelo que não é possível pelo método comparativo quantificá-los.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Museu de Arqueologia de Almada, principalmente ao Dr. Luís Barros e ao Dr. Fernando Henriques por todo o apoio dado no decorrer desta investigação. Este trabalho é financiado por Fundos Nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto UID/FIS/04559/2013.

[1] Oliveira, Maria Cidália - Moluscos Bivalves em Portugal: Composição Química e Metais Contaminantes. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2012





2017

Catarina Fonseca

Aplicação de fluorescência de raios-x para caracterização de elementos tóxicos em exosqueletos de moluscos



